

**Pathogenetische Untersuchungen zur Ausbildung unterschiedlicher  
Phänotypen und zur Vermehrung humaner Mastzellen  
bei Wundheilung und Urtikaria**

HABILITATIONSSCHRIFT  
zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach  
Dermatologie und Venerologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Frau Dr. Barbara Hermes  
geboren am 16.08.1950 in Münster

Präsident:	Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix
Eingereicht am:	14. Februar 2001
Tag der letzten Prüfung:	4. Dezember 2001
Gutachter:	1. Prof. Dr. med. Th. Rufli 2. Prof. Dr. med. T. Schwarz

*Da die Natur im Kleinen und Kleinsten ist, sollten wir  
auch im Kleinen und Kleinsten den Anfang suchen*

Paul Klee „Unendliche Naturgeschichte“,  
Vorlesungen 1921 - 1924.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
0. Zusammenfassung	7
1. Die Mastzelle	11
1.1 Historie	11
1.2 Entwicklung	11
1.3 Morphologie	13
1.4 Mediatoren	14
1.4.1 Proteasen	15
1.4.1.1 Tryptase	15
1.4.1.2 Chymase	16
1.4.1.3 MCT und MCTC	16
1.4.2 Wachstumsfaktoren sowie Rezeptoren	17
1.4.2.1 SCF und SCF-Rezeptor	17
1.4.2.2 NGF und NGF-Rezeptoren	19
1.4.2.3 GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor	22
1.4.2.4 TGF- $\beta$ und TGF- $\beta$ -Rezeptoren	24
1.4.2.5 IL-3	25
1.4.3 Zytokine	26
1.4.3.1 TNF- $\alpha$	26
1.4.4 Chemokine	27
1.4.4.1 IL-8	27
1.5 Spezifische Funktionen der Mastzelle in ausgewählten Krankheitsmodellen	28
1.5.1 Wundheilung / Fibrosierung und Mastzellen	28
1.5.2 Urtikaria und Mastzellen	31
2. Fragestellungen	34
3. Untersuchungsmethoden	36
3.1 Gewebe	36
3.2 Immunhistochemie	37
3.3 Enzymhistochemische sequentielle Doppelfärbung	38
3.4 Immunfluoreszenzdoppelfärbung	38
3.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Mastzellproteasen	39
3.6 Bestimmung der mitogenen Wirkung von Mastzellproteasen auf Fibrobla-	

	sten und Keratinozyten	39
3.7	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion	40
3.8	FACS-Analyse von Mastzellen	41
3.9	Mikroskopische Auswertung	42
3.10	Statistische Auswertung	43
4.	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1	Mastzellen in Narbengewebe	44
4.1.1	MCTC und MCT	44
4.1.2	c-Kit-positive Mastzellen	48
4.1.3	Pathophysiologische Bedeutung von Mastzellsubtypen in Narbengewebe	49
4.2	MC-Proteasen in Narbengewebe	52
4.2.1	Mitogene Wirkung der Mastzellproteasen auf Fibroblasten und Keratinozyten	54
4.3	Mastzellwachstums- sowie chemotaktische Faktoren und Rezeptoren in humanem Narbengewebe	59
4.3.1	SCF und SCF-Rezeptor	59
4.3.2	NGF und NGF-Rezeptoren	63
4.3.3	GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor	69
4.3.4	TGF- $\beta$ und TGF- $\beta$ -Rezeptoren	72
4.4	Kutane Expression von Mastzellwachstums- sowie chemotaktischen Faktoren und Rezeptoren bei der Urtikaria	74
4.4.1	SCF und SCF-Rezeptor	75
4.4.2	NGF-Rezeptoren	78
4.4.3	GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor	81
4.5	Kutane Expression proinflammatorischer Zytokine bei der Urtikaria	82
4.5.1	IL-3	82
4.5.2	TNF- $\alpha$	86
4.5.3	IL-8	90
5.	Zusammenfassende Betrachtung	92
6.	Literatur	96
7.	Kooperation und Danksagung	114
	Eidesstattliche Versicherung	115

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung <sup>1</sup>
AU	Akute Urtikaria
BM	Serumfreies Basismedium
bp	Basenpaare
C3a	Komplementfaktor 3a
C5a	Komplementfaktor 5a
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CRU	Chronisch-rezidivierende Urtikaria
DMEM	Dulbecco`s Minimum Essential Medium
DU	Verzögerte Druckurtikaria
ECP	Eosinophilen-kationisches Protein
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor
ELAM	Endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül
E-Selektin	Endotheliales Selektin
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	Fötales Kälberserum
FcεRI	Hoch-affiner IgE-Rezeptor
FcγRI	Hoch-affiner IgG-Rezeptor
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
GVHD	Graft-versus-host-disease
HMC1	Humane Mastzell-Leukämie-Zelllinie
HPF	Mikroskopausschnitt bei 400facher Vergrößerung (high power field )
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
LTB4	Leukotrien B4
LTC4	Leukotrien C4
MBP	Major basic protein

---

<sup>1</sup>Wenn Abbildungen sich nicht auf derselben Seite befinden wie der sich auf sie beziehende Text, wird die jeweilige Seitenzahl angegeben.

MCC	Chymasehaltige Mastzelle
MCP	Chemotaktisches Monozyten-Protein
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MCT	Tryptasehaltige Mastzelle/n
MCTC	Tryptase- und chymasehaltige Mastzelle/n
MIP	Inflammatorisches Makrophagen-Protein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NT	Neurotrophin
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDGF	Plättchenwachstumsfaktor
PGD2	Prostaglandin D2
P-Selektin	Thrombozytäres Selektin
-R	-Rezeptor
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SCF	Stammzellfaktor
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle <sup>1</sup>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Trk	Tyrosinkinase
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

---

<sup>1</sup> Wenn Tabellen sich nicht auf derselben Seite befinden wie der sich auf sie beziehende Text, wird die jeweilige Seitenzahl angegeben.

## 0. Zusammenfassung

*Sowohl bei der Wundheilung und Narbenbildung als Modell für Fibrosierung, als auch bei der Urtikaria ist beim Menschen eine Mastzellvermehrung bekannt. Während die Mastzelle bei der Urtikaria als Effektorzelle eine Schlüsselfunktion ausübt, ist bisher nicht geklärt, ob sie in ähnlich aktiver Weise zur Wundheilung beiträgt. Insbesondere liegen bisher wenige In vivo-Daten zu Mastzellen bei der menschlichen Wundheilung vor. Daher haben wir humanes Narbengewebe (N = 20) im Vergleich zu normaler Haut (N = 10) und zu Urtikaria (N = 26) hinsichtlich Mastzellphänotyp sowie Wachstumsfaktoren mit Einfluß auf Proliferation und Differenzierung von Mastzellen untersucht.*

*Mittels enzymhistochemischer sequentieller Doppelfärbung der Mastzellproteasen Chymase und Tryptase zur Bestimmung des Mastzellsubtyps haben wir in Narben eine Umkehr des Verhältnisses von MCT zu MCTC (91 : 9) im Vergleich zu normaler Haut (11 : 89) ermittelt. Die Verminderung von MCTC in Narben war hochsignifikant gegenüber normaler Haut. Dieses Verschwinden von MCTC in Narben entspricht sogenannten „Phantommastzellen“ bei sklerosierenden Prozessen der Haut in der Literatur und paßt zum Konzept der Degranulation. Die Zahl von MCT unterschied sich in Narben nicht signifikant von der in normaler Haut. Bei Ermittlung der Mastzellzahl mittels immunhistochemischer Markierung des SCF-R c-Kit (APAAP-Methode) zeigte sich eine deutliche Zunahme von Mastzellen in Narben. c-Kit wird sowohl von reifen, als auch von unreifen Mastzellen exprimiert, so daß die im Vergleich zu den mit den anderen Färbemethoden dargestellten Zellen höhere Anzahl c-Kit-positiver Zellen für die Präsenz unreifer Mastzellen in Narben spricht.*

*In Gewebsextrakten von Narben ließen sich durch Messung der Proteaseaktivitäten und in der semiquantitativen RT-PCR ein signifikanter Anstieg der Tryptaseaktivität sowie eine signifikante Abnahme der Chymaseaktivität nachweisen. Diese Befunde passen zu den immunhistochemisch in Narbengewebe erhobenen Ergebnissen mit einerseits ausgeprägter Verminderung von MCTC, andererseits kontinuierlicher Präsenz von MCT, die durch andauernde protrahierte Sekretion zur Erhöhung der Tryptaseaktivität führen könnten.*

*Bei der Bestimmung der mitogenen Wirkung der Mastzellproteasen auf Keratinozyten und Fibroblasten zeigte sich eine Zunahme der mitogenen Antwort von Fibroblasten. Beide Pro-*

*teasen übten keinerlei mitogenen Effekt auf HaCaT-Keratinocyten aus. Diese Befunde bestätigen die proliferationsfördernde Wirkung von Tryptase auf Fibroblasten und zeigen denselben Effekt auch für Chymase. Die bei Gewebstraumatisierung freigesetzten Mastzellproteasen könnten auf diese Art zur Bindegewebsreparatur beitragen.*

*Sowohl immunhistochemisch untersuchte SCF- und c-Kit-positive Zellen in Narben, als auch SCF-mRNA in Narbengewebe waren im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöht. In Narbengewebe stellen zahlreiche Zellen wie Fibroblasten, Endothel- und Mastzellen Quellen für die SCF-Sekretion dar. SCF-R-positive Zellen im Korium sind ausschließlich Mastzellen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß SCF bei der Wundheilung Effekte über diese Zellen ausübt. Insbesondere scheinen Fibroblasten-Mastzell-Interaktionen via SCF / c-Kit Bedeutung bei der Wiederherstellung der Bindegewebshomöostase zu haben.*

*NGF ist sowohl als wundheilungsfördernder Faktor, als auch als Mastzellwachstums- und -differenzierungsfaktor bekannt und wird von etlichen Zellen, darunter auch Mastzellen, exprimiert. Weder immunhistochemisch, noch in der semiquantitativen RT-PCR ließen sich jedoch Unterschiede zwischen Narbengewebe und normaler Haut bezüglich NGF-exprimierender Zellen und NGF-mRNA feststellen. Die NGF-R TrkA und p75 zeigten sich dagegen beide in Narbengewebe gegenüber normaler Haut vermehrt vorhanden, sowohl immunhistochemisch als auch in der RT-PCR. Diese Befunde stimmen mit der beschriebenen Expression dieser Rezeptoren auf verschiedenen Zelltypen überein, die bei der Wundheilung beteiligt und aktiviert sind, unter anderem Mastzellen (NGF-R-TrkA).*

*Hinsichtlich der immunhistochemischen Expression von GM-CSF und seines Rezeptors und der Bestimmung der jeweiligen mRNA ergaben sich Unterschiede zwischen Narben und normaler Haut lediglich für GM-CSF-R-positive Zellen, die sich immunhistochemisch in der mittleren und tiefen Dermis, insbesondere in frischen Narben, vermehrt zeigten. Diese erhöhte GM-CSF-R-Expression läßt sich durch das besonders in frühen Phasen der Narbenbildung dichtere Entzündungsinfiltrat erklären, das dendritische Zellen, Monozyten, Eosinophile und Neutrophile enthält, die den GM-CSF-R exprimieren können.*

*Der für die Wundheilung als wichtig erachtete Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ , der auf Mastzellen eine starke chemotaktische Wirkung ausübt, und seine beiden in den Untersuchungen berücksichtigten Rezeptoren TGF- $\beta$ -R I und II waren erwartungsgemäß jeweils immunhistochemisch*



*und in der RT-PCR in Narbengewebe signifikant hochreguliert gegenüber normaler Haut. Durch FACS-Analyse gelang erstmalig der Nachweis der TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I und II auf isolierten Hautmastzellen. So könnte TGF- $\beta$  mittels seiner Rezeptoren auf Mastzellen und aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Mastzellen zu ihrer Rekrutierung und Proliferation bei der Wundheilung beitragen.*

*Bei der Urtikaria als ebenfalls mit Mastzellvermehrung assoziierter, jedoch pathogenetisch ganz andersartiger Krankheit haben wir einerseits auch die kutane Expression von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren mit Einfluß auf Proliferation und Differenzierung von Mastzellen untersucht (SCF, SCF-R, NGF-R-TrkA, NGF-R-p75, GM-CSF, GM-CSF-R), andererseits proentzündliche und chemotaktische Zytokine (IL-3, TNF- $\alpha$ ), die eine Rolle bei der Pathogenese der Urtikaria spielen könnten.*

*Im Gegensatz zu Narbengewebe zeigte sich die immunhistochemische epidermale und dermale Expression von SCF in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten vermindert gegenüber normaler Haut. Trotz erhöhter Mastzellzahl in Urtikariagewebe ergab sich ebenfalls keine Zunahme der Zahl c-Kit-positiver dermaler Zellen im Vergleich zu normaler Haut. Mögliche Erklärungen für diese Befunde sind vielfältig, wurden jedoch nicht weiter verfolgt.*

*GM-CSF und sein Rezeptor wurden immunhistochemisch nur von wenigen Zellen exprimiert ohne Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der NGF-R war auch die NGF-R-TrkA-Expression in den untersuchten Geweben gleich. Die endotheliale und perivaskuläre NGF-R-p75-Expression zeigte sich dagegen in läsionaler im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten und zu normaler Haut vermindert. Ein bei Urtikariapatienten laut Literatur erhöht gefundener NGF-Serumspiegel könnte zu einer Herabregulation des p75-Rezeptors führen.*

*Die immunhistochemische Untersuchung von Urtikariagewebe hinsichtlich der Expression der proentzündlichen und chemotaktischen Zytokine IL-3 und TNF- $\alpha$  ergab für beide ähnliche Ergebnisse mit signifikanter Hochregulation der Expression auf dermalen Endothelzellen, z. T. auch auf perivaskulären Zellen, und zwar sowohl in läsionaler, als auch in nicht-läsionaler Urtikariahaut im Vergleich zu normaler Haut. In Verbindung mit Daten aus der Literatur stützen die Befunde ein pathophysiologisches Konzept der Urtikaria, bei dem die durch zirku-*

*lierende Faktoren unterschwellig aktivierte Endothelzelle bereits auf geringe oder unspezifische Reize reagiert.<sup>2</sup>*

---

<sup>2</sup>Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in folgenden Arbeiten publiziert: (Algermissen *et al.*, 1999; Artuc *et al.*, 1999; Henz *et al.*, 2000; Hermes *et al.*, 2000; Hermes *et al.*, 1999).

Weitere Publikationen sind im Druck (a), beziehungsweise in Vorbereitung (b):

a) Hermes, B., Welker, P., Feldmann-Böddeker, I., Krüger-Krasagakes, S., Hartmann, K., Zuberbier, T. & Henz, B.M. Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars. *J Invest Dermatol.*

b) Hermes, B., Zuberbier, T., Haas, N. & Henz B.M. Expression of mast cell growth modulating factors and their receptors in urticaria.

## 1. Die Mastzelle

### 1.1. Historie

Erstmals wurde die Mastzelle 1878 von Paul Ehrlich beschrieben. Er wählte diese Bezeichnung aufgrund ihres meist üppigen, mit Granula wie „gemästet“ erscheinenden Aussehens (Ehrlich, 1878). Im Gegensatz zu den Basophilen, mit denen sie viele Eigenschaften gemeinsam hat, ist sie gewebeständig und als reife Mastzelle nicht im peripheren Blut vorhanden. 1925 wird sie als verwandelte Bindegewebszelle mit noch völlig ungeklärten Aufgaben bezeichnet (Kyrle, 1925).

Die Isolierung von Mastzellen aus Geweben zwecks Erforschung war zunächst nicht möglich. Fortschritte bei ihrer Charakterisierung wurden in den 70er und 80er Jahren durch Untersuchungen an transgenen Mäusen, die Defekte in der Mastzellentwicklung und -homeostase aufweisen, sowie durch die Etablierung von Mastzellkulturen erzielt. Entscheidend war auch die Identifizierung von haematopoetischen Stammzellen als Progenitoren, die Untersuchungen zugänglich wurden. Mit Identifizierung und Charakterisierung einer zunehmenden Zahl von Mastzellmediatoren, -chemoattraktoren sowie Differenzierungsfaktoren und Rezeptoren werden immer mehr Funktionen und Interaktionen der Mastzelle im Rahmen allergischer und entzündlicher Prozesse sowie beim Gewebeumbau deutlich.

Zahlreiche Erkenntnisse zur Mastzelle wurden im Mausmodell und durch Zellkulturen gewonnen und müssen durch zusätzliche Erhebung von In vivo-Daten ergänzt werden, um die vielfältigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen im Gewebe zu berücksichtigen.

### 1.2. Entwicklung der Mastzelle

1979 konnte Kitamura zeigen, daß Mausmastzellen den blutbildenden Geweben wie dem Knochenmark entstammen (Kitamura *et al.*, 1979). Für die humane Mastzelle wurde die Abstammung von CD34-positiven Stammzellen aus dem Knochenmark 1991 in vitro und 1994 in vivo nachgewiesen (Födinger *et al.*, 1994; Kirshenbaum *et al.*, 1991). Die pluripotenten CD34-positiven haematopoetischen Stammzellen des Knochenmarks entwickeln sich unter

dem Einfluß von Wachstumsfaktoren zu den jeweiligen blutbildenden Zell-Linien sowie zu Mastzellprogenitoren (Whetton & Spooncer, 1998). Die Wachstumsfaktoren haben einerseits überlappende Effekte, andererseits Auswirkungen auf verschiedene Zell-Linien. Gegenwärtig wird die Vorstellung favorisiert, daß haematopoetische Stammzellen sich gemäß einem intrinsischen Zellprogramm in eine bestimmte Richtung entwickeln (stochastisches Modell) und nicht durch den Einfluß von Zytokinen in diese Richtung gelenkt werden (deterministisches Modell) (Metcalf, 1998; Nishijima *et al.*, 1997). Beim Fetus gelangen die Stammzellen über die Blutbahn in das Knochenmark. Noch im Nabelschnurblut des Neugeborenen finden sich haematopoetische Stammzellen als mögliche Quelle für Stammzelltransplantationen (Broxmeyer *et al.*, 1989). Mastzellvorläufer aus den blutbildenden Geweben zirkulieren mit dem Blut bis zur Einwanderung in die Gewebe aller größeren Organe, wo sie die weitere Differenzierung zu reifen Mastzellen durchlaufen (Czarnetzki *et al.*, 1995).

Aus Nabelschnurblut gewonnene Stammzellen sowie Mastzellvorläufer aus dem peripheren Blut wurden für In-vitro Studien kultiviert, und zahlreiche Erkenntnisse zur Regulation der Mastzellentwicklung und -differenzierung konnten gewonnen werden (Furitsu *et al.*, 1989). Ein komplexes Netzwerk von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, Rezeptoren, extrazellulärer Matrix mit synergistischen und antagonistischen Effekten ist beteiligt.

Im Maussystem entwickeln sich Knochenmarkszellen unter dem Einfluß der Wachstumsfaktoren GM-CSF und M-CSF zu Mastzell-artigen Zellen (Brambilla *et al.*, 1993). Gleichfalls für murine Mastzellen ist IL-3 ein wichtiger Wachstumsfaktor in der frühen Phase der Mastzellentwicklung, wohingegen SCF mehr Bedeutung in der späteren Phase hat. Verstärkt werden die Effekte von IL-3 und SCF durch IL-4, abgeschwächt durch GM-CSF (Bressler *et al.*, 1989; Rottem *et al.*, 1994).

Humane haematopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut bilden unter dem Einfluß von SCF und / oder NGF Mastzellcharakteristika wie Tryptase, Chymase, c-Kit und FcεRI aus (Welker *et al.*, 2000a). Auch Mastzellvorläufer aus dem peripheren Blut beim Menschen besitzen weder Tryptase, noch c-Kit, und nur wenige exprimieren den FcεRI. Diese Merkmale entwickeln sich jedoch in vitro während der Kultur mit SCF (Welker *et al.*, 2000b). Im Gegensatz zum entwicklungsfördernden Effekt auf die Mausmastzelle üben IL-3 und IL-4 auf die SCF-abhängige Differenzierung der humanen Mastzelle eine inhibitorische Wirkung aus (Sillaber *et al.*, 1994). Auch GM-CSF hemmt die Differenzierung unreifer HMC-1-Zellen, die

sie in der Kultur mit Fibroblasten-Überstand üblicherweise durchlaufen, wie die Entwicklung von Tryptase- und FcεRI-Aktivität sowie Histaminexpression (Welker *et al.*, 1997).

Wodurch die Mastzellvorläufer, die mit dem peripheren Blut zirkulieren, zur Einwanderung in Gewebe veranlaßt werden, ist bisher nicht bekannt. Wahrscheinlich werden sie durch Chemoattraktoren, die bei entzündlichen Prozessen freigesetzt werden, angezogen und verlassen die Gefäße mittels Bindung an Adhäsionsmoleküle, die sie ebenso wie Endothelzellen exprimieren (Weber *et al.*, 1997). Als potente Attraktoren für Mastzellen gelten unter anderem SCF, C3a, C5a, IL- 8 und Mitglieder der TGF-β - Familie (Hartmann *et al.*, 1997; Lippert *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1994a; Olsson *et al.*, 2000). Mastzellen finden sich in fast allen Organen und gruppieren sich besonders um Nerven, Blut- und Lymphgefäße. Vor allem in den Organen, die die Grenzflächen des Organismus nach außen bilden, nämlich Haut, Lunge und Gastrointestinaltrakt, sowie im Gehirn werden zahlreiche Mastzellen angetroffen. In den verschiedenen Geweben erfolgt weitere Ausreifung und Differenzierung der Mastzelle, wahrscheinlich wiederum gesteuert von Zytokinen und extrazellulären Matrixkomponenten abhängig vom jeweiligen Mikromilieu (Longley *et al.*, 1997a). In den Geweben sind die Mastzellen langlebig (Padawer, 1974). Mitosen finden sich nur selten, so daß eine Mastzellvermehrung am ehesten durch Einwanderung von Vorläuferzellen aus dem peripheren Blut erzielt wird.

### 1.3. Morphologie der Mastzelle

Mastzellen sind 6 - 17 µm große mononukleäre Zellen mit zahlreichen zytoplasmatischen Granula, die sich dank ihres Gehalts an Glykosaminoglykanen durch metachromatisches Färbeverhalten auszeichnen, das bei der Toluidinblaufärbung genutzt wird. Der Nucleus ist elektronenmikroskopisch ungelappt, in den Granula sind Mediatoren wie Histamin, Proteasen und Proteoglykane enthalten. In der Zellmembran finden sich diverse Rezeptoren für Wachstumsmoleküle, darunter der SCF-Rezeptor c-Kit, Sekretionsaktivatoren, z. B. der hochaffine IgE-Rezeptor FcεRI, und Adhäsionsmoleküle (Grabbe *et al.*, 1994a; Metcalfe *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1995).

Mastzellen weisen sowohl eine speziesabhängige, als auch organabhängige Heterogenität auf. Bei Nagetieren werden Mukosamastzellen von Bindegewebsmastzellen unterschieden. Erstere finden sich vorwiegend in der Dünndarmmukosa, letztere in Dünndarmsubmukosa, Haut,

Skelettmuskulatur und serösen Oberflächen. Sie unterscheiden sich hinsichtlich Morphologie, Färbeverhalten, Mediatorgehalt sowie ihrer Ansprechbarkeit auf Cytokine (Welle, 1997). Wie an mastzelldefizienten Mäusen gezeigt werden konnte, sind diese Unterschiede durch das umgebende Mikromilieu bedingt. In andere Gewebe transplantierte Mastzellen nehmen die Eigenschaften der dort normalerweise anzutreffenden Mastzellen an (Irani & Schwartz, 1989).

Eine gebräuchliche deskriptive Subtypisierung der humanen Mastzelle basiert auf ihrem Gehalt an neutralen Proteasen in den zytoplasmatischen Granula (Welle, 1997). MCT enthalten ausschließlich Tryptase und werden von MCTC unterschieden, die neben Tryptase auch Chymase sowie Carboxypeptidase und eine Cathepsin - ähnliche Proteinase enthalten (weiteres siehe unter 1.4.1.3). Humane Mastzellen weisen auch eine Heterogenität hinsichtlich des Zytokinprofils auf, das sich in Abhängigkeit von Lokalisation und Stimulation bzw. Kulturbedingungen ändern kann (siehe auch unter 1.5.2) (Bradding *et al.*, 1995b; Lorentz *et al.*, 2000).

#### 1.4. Mediatoren

Mastzellen besitzen einerseits präformierte, in sekretorischen Granula gelagerte Mediatoren wie Histamin, Proteasen und Proteoglykane (Heparin, Chondroitinsulfat E), außerdem TNF- $\alpha$  und VEGF. Andere Mediatoren werden nach Mastzellaktivierung sehr schnell aus Membranphospholipiden generiert, darunter Leukotriene (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>), Komplementfaktoren (C3a, C5a) und PAF. Die Mastzelle produziert außerdem Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Zytokine, unter anderem IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, FGF-2, PDGF, GM-CSF, TGF- $\beta$  sowie NGF, und besitzt etliche membranständige Rezeptoren. Diese Eigenschaften deuten auf multiple Effektorfunktionen der Mastzelle nicht nur bei allergischen Reaktionen, sondern auch bei Gewebeumbau und –wiederherstellung hin. Im folgenden wird auf die Mediatoren und Rezeptoren ausführlicher eingegangen, auf die sich die weiter unten beschriebenen Untersuchungen an humanem Narben- und Urtikariagewebe konzentrieren.

#### 1.4.1. Proteasen

##### 1.4.1.1. Tryptase

Tryptase ist eine neutrale Serinprotease und wesentlicher Bestandteil der Mastzellgranula. Als spezifischer Mastzellmarker ist sie in praktisch allen, auch unreifen humanen Mastzellen entweder in der  $\beta$ - oder zusätzlich in der  $\alpha$ -Form enthalten, wohingegen Basophile nur geringe Mengen von  $\alpha$ -Tryptase aufweisen (Algermissen *et al.*, 1994; Harvima *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Irani & Schwartz, 1989; Xia *et al.*, 1995). Sie entwickelt enzymatische Aktivität erst, wenn sich die vier 34 - 37 kD großen Untereinheiten zu einem mit Heparin assoziierten stabilen Tetramer verbunden haben (Harvima *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1981). Bisher sind eher wenige physiologische Substrate der Tryptase identifiziert wie Fibrinogen oder Komplement C3, das zum Komplementfaktor 3a metabolisiert wird (Huang *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1983). Tryptase ist in der Lage, das Neuropeptid VIP, jedoch nicht Substanz P zu inaktivieren (Caughey *et al.*, 1988).

Tryptase beeinflusst den Bindegewebsmetabolismus in vielerlei Hinsicht. Einerseits fördert sie die Bindegewebsneubildung, andererseits begünstigt sie Ab- bzw. Umbauprozesse und könnte damit eine Rolle im Rahmen der Wundheilung übernehmen (Gruber & Schwartz, 1990). Zu den beschriebenen Effekten von Tryptase gehören Erhöhung der Typ I-Kollagen-Synthese humaner Lungenfibroblasten, Hochregulierung der Prokollagen-mRNA-Synthese humaner dermaler Fibroblasten, Aktivierung von Prokollagenase zu Kollagenase und von Pro-Urokinase sowie Spaltung von Typ IV-Kollagen, Fibronectin, Elastase und Proteoglykanen (Atkins & Clark, 1987; Cairns & Walls, 1997; Gruber *et al.*, 1997; Gruber *et al.*, 1989; Lohi *et al.*, 1992; Stack & Johnson, 1994). Tryptase steigert die Fibroblastenproliferation sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen (Akers *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 1992; Levi-Schaffer & Kupietzky, 1990; Levi-Schaffer & Rubinchik, 1995; Ohtsuka, 2000; Ruoss *et al.*, 1991; Trautmann *et al.*, 1998). Daneben wurde Tryptase von HMC-1-Zellen in vitro als angiogenetischer Faktor identifiziert (Blair *et al.*, 1997). Außerdem wurden mitogene Effekte von Tryptase auf Epithelzellen in vitro beschrieben sowie Stimulation der IL-8-Freisetzung aus Epithelzellen in Verbindung mit einer Hochregulierung der ICAM-1-Expression (Cairns & Walls, 1996).

#### 1.4.1.2. Chymase

Nach Tryptase ist Chymase die zweite in größeren Mengen in Mastzellgranula vorhandene Protease - ebenfalls eine Serinprotease mit einer Molmasse von ca 25 kDa. Entsprechend der Verteilung der MCTC wird sie vor allem in Haut, Darmsubmukosa und in geringen Mengen in der Lunge angetroffen. Unreife Mastzellen zeigen keine Chymaseaktivität (Czarnetzki *et al.*, 1995). Chymase konvertiert Angiotensin I zu Angiotensin II, fördert die sekretorische Aktivität der submukösen Drüsen der Atemwege und inaktiviert Bradykinin und Kallidin sowie Substanz P und VIP (Nadel, 1991). Erst kürzlich wurde gezeigt, daß aus Mastzellgranula freigesetzter SCF durch Chymase zur biologisch aktiven Variante SCF1-159 gespalten wird (de Paulis *et al.*, 1999a; Longley *et al.*, 1997b). Diese Fähigkeit kann zu autokrinen Rückkopplungsmechanismen der Mastzellrekrutierung beitragen.

Am 3. Tag nach Setzen einer Wunde bei der Maus waren Mastzellzahl und Chymaseaktivität maximal abgefallen mit deutlichem Anstieg parallel zur Retraktion der Wunde zwischen dem 7. und 14. Tag (Nishikori *et al.*, 1998). Chymase aus Hundemastozytomen aktiviert MMP-1 und -3, die in aktivierter Form in den Bindegewebsstoffwechsel eingreifen (Lees *et al.*, 1994). Außerdem konnte gezeigt werden, daß Mastzellen aus Hundemastozytomen selbst eine inaktive Progelatinase sezernieren, die alsbald von gleichfalls sezernierter Chymase aktiviert wird (Fang *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1996). Humane Mastzellchymase kann Prokollagen zu fibrillärem Kollagen verarbeiten als Hinweis auf eine mögliche Funktion bei der Kollagenbiosynthese (Kofford *et al.*, 1997). Angiotensin II, das unter Einwirkung von Chymase aus Angiotensin I gebildet wird, stimuliert die Keratinozytenproliferation (Steckelings *et al.*, 1996).

#### 1.4.1.3. MCT und MCTC

MCT finden sich vor allem in der Lunge und intestinalen Schleimhaut, wohingegen MCTC insbesondere in der Haut und Dünndarmsubmukosa anzutreffen sind (Irani *et al.*, 1986; Irani *et al.*, 1991; Schechter *et al.*, 1990). Auch ausschließlich chymasehaltige Mastzellen werden beschrieben, die vor allem in der Darmschleimhaut und nur ganz vereinzelt in der Haut ansässig zu sein scheinen (Li *et al.*, 1996; Weidner & Austen, 1993). In den meisten Geweben kommen MCT und MCTC unter normalen Bedingungen in relativ konstantem Verhältnis vor, das sich bei pathologischen Veränderungen des Mikromilieus unter dem Einfluß von Zytokinen ändern kann. In der Haut finden sich ca 88 % MCTC und 12 % MCT (Galli, 1990; Irani



*et al.*, 1986; Irani & Schwartz, 1989). Entzündungen der Haut führen zu einem Anstieg der MCT bei gleichbleibender Gesamtmastzellzahl (Algermissen *et al.*, 1994). Eine relative Vermehrung von MCT wurde bei der Sklerodermie, bei Lungenfibrose und rheumatoider Arthritis hingegen eine Zunahme von MCTC beobachtet (Irani *et al.*, 1992; Irani & Schwartz, 1989). In Gegenwart von SCF und Il-6 kultivierte humane tryptasepositive Mastzellen aus Nabelschnurblut zeigten nach Zusatz von Il-4 morphologische Differenzierung und signifikante Chymaseexpression (Toru *et al.*, 1998). Hierzu paßt die präferentielle Il-4-Expression durch MCTC und weniger durch MCT (Bradding *et al.*, 1995b). Proteasegehalt und Zytokinprofil humaner Mastzellen scheinen sich gegenseitig zu beeinflussen.

#### 1.4.2. Wachstumsfaktoren sowie Rezeptoren

##### 1.4.2.1. SCF und SCF-Rezeptor

Seinem Namen entsprechend ist der SCF Wachstumsfaktor für Knochenmarksstammzellen sowie Megakaryozyten, hat jedoch zusätzliche Funktionen hinsichtlich Wachstum, Differenzierung und Funktion von Mastzellen und Melanozyten. Das humane SCF-Molekül besteht aus 248 Aminosäuren, beinhaltet ein N- und ein O-glykolysiertes Protein und existiert in löslicher und membrangebundener Form. Das Gen für SCF befindet sich auf dem humanen Chromosom 12. In der Haut wird SCF von Fibroblasten, Keratinozyten, Endothel-, Mast- und Langerhanszellen produziert (Grabbe *et al.*, 1994b). SCF liegt sowohl in transmembranöser, als auch in löslichen Formen vor (Huang *et al.*, 1992). Beide Formen scheinen aktiv zu sein; jedoch sind Verteilung im Gewebe und biologische Bedeutung bisher kaum bekannt (Lukasc *et al.*, 2000). Der Nachweis der Produktion und Expression von löslichem und membrangebundenem SCF durch humane Mastzellen ist erst kürzlich geführt worden (de Paulis *et al.*, 1999a; Welker *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998).

SCF fördert die Proliferation humaner Mastzellen, jedoch nur in Zusammenwirken mit anderen Zytokinen, wie z. B. IL-4 (Bischoff *et al.*, 1999). Außerdem fördert SCF die Mediatorausschüttung sowie das Überleben von Mastzellen durch Hemmung der Apoptose (Galli *et al.*, 1995). Die subcutane Injektion von SCF führte beim Menschen zu Mastzelldegranulation sowie zur Vermehrung von Mastzellen und Melanozyten (Costa *et al.*, 1996). SCF ist neben den Komplementfaktoren C3a und C5a sowie TGF- $\beta$  ein potenter Chemoattraktor für

Mastzellen (Hartmann *et al.*, 1997).

Die ersten Mastzellkulturen erfolgten mit Fibroblastenüberständen sowie auf murinen 3T3-Fibroblasten (Czarnetzki *et al.*, 1984; Czarnetzki *et al.*, 1980; Furitsu *et al.*, 1989). Erst später wurde der von den Fibroblasten sezernierte und die Mastzellentwicklung begünstigende Faktor als SCF identifiziert, der inzwischen üblicherweise für Mastzellkulturen verwendet wird (Mitsui *et al.*, 1993; Valent *et al.*, 1992).

Der SCF-Rezeptor, auch c-Kit genannt, ist eine membranständige Tyrosinkinase und Produkt des Protoonkogens c-kit, das beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosomen 4 lokalisiert ist. Auffällige Pigmentstörungen bei der Maus führten zur Entdeckung des c-Kit-kodierenden Gens, auf dem der mutierte white-spotting-Locus der Maus liegt (Galli *et al.*, 1993; Grabbe *et al.*, 1994b). C-Kit wird von etlichen Tumorzellen sowie einigen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, in der Haut physiologischerweise nur von Mastzellen und Melanozyten [Übersicht in (Grabbe *et al.*, 1994b)].

Im Gegensatz zu den meisten anderen hämatopoetischen Zell-Linien bleibt die SCF-R-Expression bei Mastzellen über die Differenzierungsphase hinaus erhalten (Galli *et al.*, 1993; Valent, 1995). Von Mayrhofer *et al.* wurden auch c-Kit-negative Mastzellen in humanem Gewebe gefunden (Mayrhofer *et al.*, 1987). Die humane Mastzell-Linie HMC-1 weist genetische Defekte des c-kit im Bereich von Codon 816 und 560 auf, die zu kontinuierlicher Aktivierung dieser Zellen führen (Furitsu *et al.*, 1993). C-Kit-mRNA und -Proteinexpression von humanen Mastzellen und von HMC-1-Zellen werden durch SCF herunterreguliert (Baghestanian *et al.*, 1996).

SCF und die Interaktion von SCF mit seinem Rezeptor c-Kit beeinflussen den Bindegewebsstoffwechsel in vielfältiger Weise. Kürzlich wurde gezeigt, daß humane Mastzellen (HMC-1) die durch Fibroblasten bewirkte Kontraktion eines Kollagen-Gels signifikant verstärken können und zwar mittels Zell-Zell-Kontakt zumindest teilweise via SCF / c-Kit-Interaktion, da der Effekt durch Antikörper gegen SCF und c-Kit weitgehend aufgehoben werden konnte (Yamamoto *et al.*, 2000). Bei der Maus wurde gezeigt, daß SCF die Adhäsion von Mastzellen an Bindegewebsmatrix (Fibronektin) fördert (Dastyh & Metcalfe, 1994). In einem anderen Tiermodell (Hundemastozytom) wird die Expression der matrixabbauenden Metalloproteinase Progelatinase B durch SCF induziert, dieser Effekt wiederum durch TGF- $\beta$

reduziert (Fang *et al.*, 1999). In einer Co-Kultur von Mausmastzellen und Fibroblasten ließ sich durch Zugabe von PDGF eine Mastzellproliferation via membrangebundenem SCF der Fibroblasten erzielen. PDGF gilt als potentes fibrosierungsförderndes Zytokin und wird von Thrombozyten, Neutrophilen und Mastzellen sezerniert (Artuc *et al.*, 1999; Hiragun *et al.*, 1998). Humaner SCF wiederum kann via von menschlichen Thrombozyten exprimiertem c-Kit Einfluß auf deren Aktivierung nehmen, z. B. im Rahmen einer Verletzung, so daß hier ein Feedback-Mechanismus bei der Wundheilung denkbar ist (Grabarek *et al.*, 1994).

In der frühen Phase der systemischen Sklerodermie wurde immunhistochemisch eine vermehrte epidermale und dermale SCF-Expression gefunden, nicht jedoch in der späten atrophischen Phase. Auch die Serum-SCF-Spiegel waren erhöht mit einem Gipfel in der sklerotischen Phase. Eine Aktivierung der Melanozyten durch löslichen SCF im Serum könnte die eine Sklerodermie begleitende Hyperpigmentierung der Haut erklären (Kihira *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.2. NGF und NGF-Rezeptoren

Der Nervenwachstumsfaktor NGF wurde 1954 in Speicheldrüsen der Maus identifiziert. Inzwischen ist bekannt, daß er von etlichen Zellen synthetisiert wird wie Keratinozyten, Fibroblasten, Mastzellen, epidermalen Merkel-Zellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und CD4-positiven Lymphozyten, außerdem in Schwann-Zellen und Astrozyten sowie weiteren neuronalen Geweben, Testes und C-Zellen der Schilddrüse. Insbesondere in der Haut finden sich größere Mengen von NGF. Das Molekül besteht aus einem 26 kDa homodimeren Polypeptid mit jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Biologisch aktiv ist die  $\beta$ -Untereinheit, die zur Kallikreinfamilie gehört. Das Gen für NGF liegt beim Menschen auf dem Chromosom 1p13. NGF ist nicht nur unentbehrlich für die Entwicklung von neuronalen Geweben, sondern moduliert auch Immunantworten und stimuliert die Wundheilung (Bothwell, 1997; Leon *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1980; Matsuda *et al.*, 1998; Pincelli *et al.*, 1994; Welker *et al.*, 2000a; Yaar *et al.*, 1991).

Schon Paul Ehrlich, dem Namensgeber der Mastzelle, fiel vor über 100 Jahren auf, daß Mastzellen und Nervenfasern eng nebeneinander zu finden waren. Diese Beobachtung konnte unter anderem auch elektronenmikroskopisch bestätigt werden (Bienenstock *et al.*, 1987; Wiesner-Menzel *et al.*, 1981). Der Gedanke lag nahe, daß Mastzellen mittels Mediatoren auf

Wachstum und Differenzierung von Nervenfasern Einfluß nehmen könnten. Inzwischen ließ sich zeigen, daß NGF von Mastzellen produziert wird (Leon *et al.*, 1994; Nilsson *et al.*, 1997). Neben SCF ist NGF jedoch auch ein wichtiger Wachstumsfaktor für Mastzellen und fördert bei Nagetieren Mastzelldifferenzierung, -überleben und -mediatorfreisetzung (Henz *et al.*, 2000; Kawamoto *et al.*, 1995; Marshall *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 1991). Beim Menschen wirkt NGF als Wachstumsfaktor für Basophile (Valent, 1995). Erst kürzlich gelang der Nachweis, daß NGF auch für die humane Mastzelldifferenzierung ein wesentlicher Faktor ist (Henz *et al.*, 2000; Welker *et al.*, 2000a; Welker *et al.*, 1998).

Zwei unterschiedliche NGF-Rezeptoren wurden identifiziert, zum einen ein 75 kDa Glykoprotein (p75), zum anderen ein 140 kDa-Rezeptor (TrkA), der zu der Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehört und Produkt des Tyrosin-Rezeptor-Kinase A-Proto-Onkogens ist. TrkA bindet außer NGF auch NT-3. Strukturell homologe Rezeptoren TrkB und TrkC binden weitere Neurotrophine. Die Bindung der Liganden führt zu einer Phosphorylierung des Rezeptors. Der Trk wird vorwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert, außerdem von Keratinozyten, Melanozyten und Monozyten. Auch für humane Mastzellen (HMC-1, Lungenmastzellen, aus Nabelschnurblut gewonnene unreife Mastzellen) konnte die Expression des Trk nachgewiesen werden (Henz *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 1997; Tam *et al.*, 1997; Welker *et al.*, 1998).

Der p75-NGF-R bindet alle Neurotrophine und wird von zahlreichen Zelltypen exprimiert, darunter in der Haut von basalen Keratinozyten, äußeren Lagen der Haarwurzelscheiden und Talgdrüsen, Melanozyten sowie sensorischen und autonomen Nervenfasern (Di Marco *et al.*, 1993; Henz *et al.*, 2000; Ribeiro-da-Silva *et al.*, 1991). In peritonealen Mastzellen von Ratten konnte der Trk, jedoch nicht der p75-NGF-R nachgewiesen werden (Kawamoto *et al.*, 1995). Bei Mäusen scheint der p75-NGF-R bei der IL-3- und NGF-induzierten Mastzelldifferenzierung eine Rolle zu spielen, da bei p75-NGF-R-defizienten Mäusen der Differenzierungseffekt von NGF ausblieb (Jippo *et al.*, 1997). Humane HMC-1-Zellen exprimieren den p75-NGF-R nicht (Nilsson *et al.*, 1997). Nur eine sehr schwache Bande der mRNA konnte nachgewiesen werden, jedoch kein Rezeptorprotein (Welker *et al.*, 1998).

Ein Einfluß von NGF auf den Bindegewebsmetabolismus wurde 1979 von Hutson *et al.* beschrieben, die beobachtet hatten, daß Mäuse durch Lecken ihrer Wunden die Wundheilung beschleunigen konnten, wohingegen Entfernung der an NGF reichen Glandula submandibula-

ris zu einer verzögerten Wundheilung führte. Wie das Lecken einer Wunde führte auch aus Speicheldrüsen extrahierter und topisch auf die Wunde aufgetragener NGF zu einer Beschleunigung der Wundheilung (Hutson *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1980). Auch wenn vor dem Setzen einer Wunde bei Mäusen die Speicheldrüsen operativ entfernt worden waren, um eine Sekretion von NGF aus den Speicheldrüsen in den Blutkreislauf zu vermeiden, ließen sich in neugebildeten Keratinozyten vom Wundrand sowie in Fibroblasten des Granulationsgewebes NGF-mRNA und -Protein nachweisen als Hinweis auf einen Beitrag des NGF im Rahmen der Wundheilung (Matsuda *et al.*, 1998).

Die NGF-Synthese wird durch bei Verwundung freigesetzte Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$  und PDGF induziert. NGF wiederum fördert die Mastzelldegranulation mit weiterer Freisetzung von Mediatoren, so daß sich ein Feedbackmechanismus ergeben könnte (Marshall *et al.*, 1990; Tal & Liberman, 1997). Bei der Ratte bewirkt NGF gezielte Migration von Mastzellen zu Fibroblasten, die zu einer Mastzellakkumulation beispielsweise bei der Wundheilung beitragen könnte (Sawada *et al.*, 2000).

NGF fördert die Entwicklung sensorischer Hautnerven. Nach Nervenverletzung induziert IL-1 die NGF-Synthese von Schwann-Zellen. Blockierung von IL-1 $\beta$  nach Hirnverletzung unterdrückt sowohl die NGF-Synthese, als auch die durch NGF eingeleiteten reparativen Prozesse (DeKosky *et al.*, 1996). NGF wirkt auf Neutrophile bei der Maus chemotaktisch. Subdermale Injektion von NGF löst Einwanderung von Zellen aus ähnlich der nach einer Verletzung (Boyle *et al.*, 1985; Lawman *et al.*, 1985). Außerdem stimuliert NGF die humane Keratinozytenproliferation direkt sowie indirekt via Neuropeptide, die unter dem Einfluß von NGF vermehrt von sensorischen Fasern gebildet werden, und erhöht die Mitogenität mehrerer Wachstumsfaktoren für humane kultivierte Keratinozyten (Di Marco *et al.*, 1991; Di Marco *et al.*, 1993; Haegerstrand *et al.*, 1989; Wilkinson *et al.*, 1994). Lokal applizierter NGF führte nach Verletzung der Rattencornea zu einer beschleunigten Abheilung (Lambiase *et al.*, 2000).

Der p75-NGF-R wird in exponentiellen Phasen der Keratinozytenproliferation heraufreguliert. Nach Differenzierung und Schichtung des Epithels nimmt die Rezeptorexpression ab (Di Marco *et al.*, 1991; Di Marco *et al.*, 1993; Wilkinson *et al.*, 1994). In der Dermis von Patienten mit systemischer Sklerodermie zeigt sich immunhistochemisch eine vermehrte Expression von NGF (Tuveri *et al.*, 1993).

#### 1.4.2.3. GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor GM-SCF ist ein 23 kDa Glykoprotein, das Proliferation, Differenzierung und Funktion hämatopoetischer Zellen stimuliert. Beim Menschen liegt das entsprechende Gen auf dem Chromosom 5q22-31. GM-CSF wird von etlichen Zellen sezerniert, darunter T- und B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten sowie Mastzellen, z.T. nach Aktivierung durch Zytokine (Nimer & Uchida, 1995).

Die Induktion der GM-CSF-Expression und -sekretion muriner und humaner Mastzellen kann durch Aktivierung des hoch-affinen IgE-Rezeptors FcεRI vermittelt werden und läßt sich durch den zusätzlichen Einfluß von SCF steigern (Bressler *et al.*, 1997; Meade *et al.*, 1993; Okayama *et al.*, 1998). Aktuell wurde gezeigt, daß Mastzellen den hoch-affinen IgG-Rezeptor FcγRI exprimieren und daß Aktivierung der Mastzellen durch Hochregulierung dieses Rezeptors nach Zugabe von Interferon  $\gamma$  ebenso zu einem Anstieg der mRNA-Expression für GM-CSF führt, außerdem für TNF- $\alpha$ , IL-3 und IL-13 (Okayama *et al.*, 2000).

Die IL-3-abhängige Entwicklung von murinen Mastzellen aus Knochenmarkzellen wird durch GM-CSF supprimiert (Bressler *et al.*, 1989). Auch Mastzellcharakteristika, die unreife HMC-1-Zellen in der Kultur mit Fibroblasten-Überstand entwickeln, wie Tryptase-Aktivität, Histamingehalt und FcεRI-Aktivität, werden bei Zusatz von GM-CSF deutlich herunterreguliert, so daß über GM-CSF ein negativer Feedbackmechanismus hinsichtlich der Mastzelldifferenzierung und -aktivität laufen könnte (Welker *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu ist GM-CSF ein Differenzierungsfaktor für humane Basophile (Tsuda *et al.*, 1991; Valent, 1995). Bei Mausmastzellen kann GM-CSF die durch IL-4 induzierte Fähigkeit zur Antigenpräsentation steigern (Frاندji *et al.*, 1995).

Der GM-CSF-R besteht aus 2 Untereinheiten, die durch Aggregation den hoch-affinen GM-CSF-R bilden. Ein weiterer Rezeptor intermediärer Affinität wurde bei der Maus auf Langerhans-Zellen gefunden. GM-CSF-R werden unter anderem von dendritischen Zellen, Monozyten, Eosinophilen, Neutrophilen, hämatopoetischen Zellen sowie Endothelzellen exprimiert. Mastzellen scheinen im Verlauf des Reifungsprozesses den GM-CSF-R zu verlieren (Cannistra *et al.*, 1990; Kampgen *et al.*, 1994; Valent, 1995).

Neben den Effekten auf die Hämatopoese kann GM-CSF auch die Wundheilung in vielerlei Hinsicht beeinflussen. Zum einen fördert GM-CSF Chemotaxis, Zelladhäsion von Leukozyten sowie Synthese und Freisetzung zahlreicher Mediatoren, insbesondere durch Eosinophile und Neutrophile. Superoxide, Leukotriene, PAF und Arachidonsäure werden sezerniert und Phagozytoseaktivität sowie Zytotoxizität dieser Zellen unter dem Einfluß von GM-CSF gesteigert. Auch Proliferation, phagozytische und antimikrobielle Aktivität von Makrophagen werden durch GM-CSF stimuliert, zudem Endothelzellmigration und -proliferation sowie Keratinozytenwachstum und Ausbildung von Myofibroblasten (Braunstein *et al.*, 1994; Canturk *et al.*, 1999; Gabbiani, 1994; Jones, 1993; Jyung *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*, 1992). Der Stimulation von Keratinozyten steht eine proapoptotische Wirkung von GM-CSF auf Keratinozyten gegenüber, durch die die epidermale Homoeostase aufrechterhalten wird (Breuhahn *et al.*, 2000). Durch Gewebstrauma freigesetztes IL-1 führt zu vermehrter GM-CSF-Synthese von Keratinozyten und Fibroblasten (Kaushansky *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1988).

Aufgrund dieser zahlreichen, zum Teil in vitro gefundenen, potentiell wundheilungsfördernden Effekte von GM-CSF erfolgte die Applikation von GM-CSF in Anwendungsstudien und Einzelfällen von erschwerter Wundheilung beim Menschen (Da Costa *et al.*, 1999; Jaschke *et al.*, 1999; Stagno *et al.*, 1999). Eine Studie an gesunden Probanden mit Injektion von GM-CSF in Schnittwunden führte allerdings nicht zu schnellerer Wundheilung, jedoch zu einem Anstieg von IL-8 im Wundsekret (Ure *et al.*, 1998). Bei der Ratte führte die lokale GM-CSF-Infiltration vor Setzen der Wunde zu vermehrter Festigkeit des Narbengewebes. Dieser Effekt konnte durch Applikation von TGF- $\beta$  in die Wunde noch verbessert werden (Smith *et al.*, 2000).

#### 1.4.2.4. TGF- $\beta$ und TGF- $\beta$ -Rezeptoren

Die Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Moleküle spielen eine Hauptrolle bei der Steuerung von Zellwachstum und -differenzierung, bei reparativen Prozessen sowie bei der Einleitung von entzündlichen Prozessen durch chemotaktische Wirkung auf Entzündungszellen und Fibroblasten (Artuc *et al.*, 1999; Lawrence, 1996). TGF- $\beta$  liegt in drei Isoformen vor: TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  2 und TGF- $\beta$  3. Jede dieser Isoformen wird von einem eigenen Gen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. In den meisten Zelltypen liegt TGF- $\beta$  vor, jedoch in latenter Form, die der Aktivierung bedarf. Bei der Wundheilung scheint die Bindung an Thrombospondin, das von Thrombozyten freigesetzt wird, wesentlich für die Aktivierung zu sein. TGF- $\beta$  inhibiert die Proliferation der meisten Zelltypen, kann aber je nach Situation und Mikromilieu auch proliferationsfördernd wirken, insbesondere auf mesenchymale Zellen.

Von mehreren bisher identifizierten TGF- $\beta$ -bindenden Proteinen wurden die TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I und Typ II auf HMC-1-Zellen und die Rezeptoren Typ I und Typ III auf Nagetiermastzellen nachgewiesen (Gruber *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 2000). In humaner Haut ließen sich die Typ I- und II-Rezeptoren in der Epidermis, in Hautanhangsgebilden und in vaskulären Zellen, jedoch nur in wenigen Fibroblasten nachweisen (Schmid *et al.*, 1998).

HMC-1-Zellen exprimieren mRNA für TGF (Möller *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1995). TGF übt auf Mastzellen eine ausgeprägte chemotaktische Wirkung aus, die die von SCF weit übertrifft (Gruber *et al.*, 1994; Olsson *et al.*, 2000). Bei Ratten hemmt TGF- $\beta$  1 Histamin- und TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus Mastzellen (Bissonnette *et al.*, 1997). Bei der murinen Mastzelle führt IL-3-Entzug zur Apoptose, die durch SCF via c-Kit verhindert werden kann. TGF- $\beta$  hebt diesen antiapoptotischen Effekt von SCF auf, möglicherweise durch Herunterregulation des c-Kit (Mekori *et al.*, 1995).

Den Bindegewebsmetabolismus beeinflussen die TGF- $\beta$ -Moleküle in mehrfacher Weise. IgE-abhängige Aktivierung von murinen Mastzellen führt zur Sekretion von TGF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  mit jeweils ausgeprägtem proliferativem Effekt auf Fibroblasten (Gordon & Galli, 1994; Kendall *et al.*, 1997). Expression und Freisetzung von  $\beta$ -Chymase aus murinen Mastzellen wird durch TGF- $\beta$  gesteigert. Bei muriner dermaler Sklerose führt anti-TGF- $\beta$  zu einer Abnahme der Fibrose sowie zu vermindertem Influx von Mastzellen (Miller *et al.*, 1999; Yama-



moto *et al.*, 1999). In Fibroblasten von Keloiden wurde eine im Vergleich zu normalen Fibroblasten erhöhte Expression von TGF- $\beta$  1 und TGF- $\beta$  2 festgestellt bei unveränderter Expression von TGF- $\beta$  3. Vor allem TGF- $\beta$  1 und 2 werden als Fibrose-induzierende Zytokine angesehen und fanden sich auch in entzündlich veränderter Haut bei Morphea und systemischer Sklerodermie beim Menschen (Lee *et al.*, 1999; Querfeld *et al.*, 1999). Im Rahmen der Wundheilung beim Menschen nahm die Anzahl der die TGF- $\beta$ -R Typ I und II exprimierenden dermalen Fibroblasten gegenüber normaler Haut zu und verringerte sich wieder mit fortschreitendem Heilungsprozess, nicht jedoch bei hypertropher Narbenbildung (Schmid *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.5. IL-3

IL-3, ein Glykoprotein, ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der von T-Lymphozyten, Monozyten, Endothelzellen, Granulozyten und Mastzellen sezerniert wird und ähnlich wie GM-CSF Überleben, Proliferation und Differenzierung der unterschiedlichen blutbildenden Zell-Linien fördert (Kita *et al.*, 1991; Möller *et al.*, 1998; Oster *et al.*, 1991; Schrader, 1986; Sigounas *et al.*, 1997). Auch für die murine Mastzelle gilt IL-3 als wesentlicher Wachstumsfaktor. Entzug von IL-3 führt zur Apoptose (Mekori *et al.*, 1993). Beim Menschen fördert IL-3 *in vitro* vor allem die Entwicklung von Basophilen, weniger die von Mastzellen (Kirshenbaum *et al.*, 1989).

Zusätzlich zu den hämatopoetischen Effekten beeinflusst IL-3 auch Immun- und Entzündungsreaktionen. Es verstärkt die Mediatorfreisetzung aus Eosinophilen und Basophilen (Brunner *et al.*, 1993; Hirai *et al.*, 1988; Rothenberg *et al.*, 1988; Warringa *et al.*, 1991). Eine Patientin mit einem Mesotheliom entwickelte unter einer Therapie mit subcutanen Injektionen von IL-3 Anstieg von Basophilen, Eosinophilen und Histamin im peripheren Blut sowie erythematöse pruritische Plaques an den Injektionsstellen. Histologisch fanden sich zahlreiche Neutrophile und Eosinophile innerhalb des perivaskulären Zellinfiltrats (Bridges *et al.*, 1996). Rhesusaffen reagierten auf IL-3-Injektionen mit einem generalisierten Hautausschlag. Histologisch fielen zahlreiche Mastzellen auf (Volc-Platzter *et al.*, 1991). Bei Patienten mit chronischer Urtikaria zeigte sich eine deutlich verminderte IgE-medierte Histaminfreisetzung aus Basophilen, die nach Vorbehandlung dieser Zellen mit IL-3 anstieg und fast die Werte gesunder Kontrollpersonen erreichte (Zuberbier *et al.*, 1996).

IL-3 induziert anhaltende Expression von P-Selektin auf Endothelzellen. P-Selektin ist ein Adhäsionsmolekül, das *in vitro* zur Adhäsion von Leukozyten, *in vivo* zum sogenannten Rollen der Leukozyten führt. Sowohl im Serum, als auch in der Haut von Patienten mit chronisch-rezidivierender Urtikaria und Urticaria factitia wurde eine ausgeprägte Zunahme von P-Selektin festgestellt (Khew-Goodall *et al.*, 1996; Zuberbier *et al.*, 1997).

#### 1.4.3. Zytokine

##### 1.4.3.1. TNF- $\alpha$

Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) ist ein nicht glykolysiertes Protein (Molmasse 17 kDa) und wird von praktisch allen ortsständigen Hautzellen ebenso wie von infiltrierenden Entzündungszellen exprimiert. Auch ein hochaffiner membranständiger TNF-Rezeptor wird in allen Geweben exprimiert. Besonders groß ist die Rezeptordichte in Haut und Lunge. Zusätzlich existieren lösliche TNF-Rezeptoren (Luger *et al.*, 1997; Wakefield *et al.*, 1991). Mit der Identifizierung von TNF- $\alpha$  wurde seine Fähigkeit entdeckt, Regression von Tumorgewebe einzuleiten, die zur Namensgebung führte. Inzwischen sind zahlreiche weitere Effekte von TNF- $\alpha$  bekannt, der als multifunktionales Zytokin eine zentrale Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen spielt, zum Teil über Induktion weiterer Mediatoren, unter anderem IL-8, GM-CSF, TGF- $\beta$ , Leukotriene und Kollagenase. Einerseits übt TNF- $\alpha$  bei Infektionen eine protektive Wirkung aus über chemotaktische Effekte, Stimulation antimikrobieller Aktivität von Leukozyten und Makrophagen, andererseits kann er Entzündungsprozesse chronifizieren oder bei akuter Infektion zu den Symptomen des septischen Schocks beitragen (Wakefield *et al.*, 1991).

Bereits 1980 wurde eine zytotoxische Wirkung von Mausmastzellen auf Tumorgewebe beschrieben (Farram & Nelson, 1980). Später wurde TNF- $\alpha$  als Mediator sowohl muriner als auch humaner Mastzellen identifiziert. Mastzellen sind die einzigen Zellen, die einen präformierten Gehalt an TNF- $\alpha$  besitzen und zwar in zytoplasmatischen Granula. Nach Degranulation steht somit TNF- $\alpha$  unmittelbar zur Einleitung entsprechender Abwehrreaktionen zur Verfügung, andererseits sind Mastzellen in der Lage, nach Stimulation TNF- $\alpha$  neu zu produzieren, um so die jeweilige Reaktion aufrechtzuerhalten (Gordon & Galli, 1990; Gordon & Galli, 1991; Walsh *et al.*, 1991). TNF- $\alpha$  seinerseits stimuliert Mediatorfreisetzung aus menschlichen

Hautmastzellen und übt durch Induktion des Adhäsionsmoleküls ELAM-1 auf humanen dermalen Endothelzellen eine entzündungsfördernde Wirkung aus (van Overveld *et al.*, 1991; Walsh *et al.*, 1991).

Bei der allergischen Entzündung und besonders deren Aufrechterhaltung und Perpetuierung spielt TNF- $\alpha$  eine wesentliche Rolle, wie an Haut und Schleimhäuten gezeigt wurde. Dieses Zytokin trägt im Rahmen der IgE-mediierten kutanen Spätphasenreaktion bei der Maus wesentlich zur mastzellabhängigen Leukozyteninfiltration bei (Wershil *et al.*, 1991). In der Nasenschleimhaut von atopischen Patienten zeigte sich nach Allergenexposition ein signifikanter Anstieg von TNF- $\alpha$  in der Spülflüssigkeit. Bei Patienten mit Asthma bronchiale ließ sich immunhistochemisch in Biopsien der Bronchialschleimhaut eine Vermehrung TNF- $\alpha$ -positiver Mastzellen nachweisen (Bradding *et al.*, 1995a; Bradding *et al.*, 1994). Bei Patienten mit Kälteurtikaria fanden sich erhöhte Werte für TNF- $\alpha$  im peripheren Blut (Tillie-Leblond *et al.*, 1994).

#### 1.4.4. Chemokine

##### 1.4.4.1. IL-8

Rekrutierung von Leukozyten ist ein wichtiger Vorgang bei jeglichen Entzündungsprozessen. Er wird von diversen chemotaktischen Mediatoren kontrolliert. Hierzu gehören neben Lipidmediatoren, Anaphylatoxinen und bakteriellen Peptiden auch bestimmte Zytokine und Chemokine. Zu letzterer Gruppe gehört IL-8, ein nicht glykolysiertes Protein mit einer Molmasse von 9 kDa, das von zahlreichen Zellen produziert wird, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Melanozyten, aktivierten Monozyten und anderen [s. Übersicht in (Kownatzki & Norgauer, 1998)]. Auch von HMC-1-Zellen und stimulierten Mastzellen der humanen Haut wird IL-8 exprimiert (Möller *et al.*, 1993).

IL-8 aktiviert insbesondere Neutrophile und gilt als einer der stärksten Chemoattraktoren dieser Zellen. Von Mastzellen sezerniertes IL-8 führt zur Rekrutierung von Neutrophilen, die durch Heparin aus Mastzellgranula noch verstärkt werden kann, wie bei Ratten gezeigt wurde (Dias-Baruffi *et al.*, 1998). Auch auf Eosinophile übt IL-8 eine chemotaktische Wirkung aus (Oliveira *et al.*, 1996). IL-8 fördert zudem die Histaminfreisetzung aus humanen Basophilen,

ein Effekt auf humane Mastzellen konnte zunächst nicht gezeigt werden (Fureder *et al.*, 1995). Inzwischen wurden jedoch nicht nur beide IL-8-Rezeptoren auf HMC-1-Zellen, sondern auch ihre funktionelle Aktivität durch Auslösung einer IL-8-induzierten Migration, nicht aber sekretorischer Aktivitäten nachgewiesen (Lippert *et al.*, 1998).

Nach Auslösung einer Arthus-Reaktion bei Mäusen entwickelt sich ein neutrophilenreiches Entzündungsinfiltrat, bei dessen Entstehen Mastzellen, TNF- $\alpha$  und IL-8 eine wesentliche Rolle spielen (Zhang *et al.*, 1995). In Gewebeexsudat, das mittels einer Kammer über einer IgE-mediierten Spätphasenreaktion der Haut beim Menschen aufgefangen wurde, ließen sich im Vergleich zu einer Hypersensitivitätsreaktion vermehrt Histamin, Leukozyten, aktivierte Eosinophile sowie IL-8 nachweisen. Diese Phänomene wurden mit einer Mastzellstimulierung in Verbindung gebracht (Zweiman *et al.*, 1998). IL-8 konnte nach Injektion in menschliche Haut die histamininduzierte Quaddel- und Erythemreaktion ebenso wie das Neutrophileninfiltrat signifikant vergrößern (Douglass *et al.*, 1996). Nach Allergenexposition wird IL-8 von humaner Haut und von Nasenpolypen freigesetzt (Möller *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997).

## 1.5. Spezifische Funktionen der Mastzelle in ausgewählten Krankheitsmodellen

### 1.5.1. Wundheilung / Fibrosierung und Mastzellen

Klassischerweise gelten Mastzellen als Effektorzellen allergischer und anderer immunologischer Reaktionen gegen unterschiedliche Eindringlinge von außen, wie Allergene, Parasiten oder Entzündung (s. auch 1.5.2) (Abraham & Malaviya, 1997; Galli, 1997; Malaviya & Abraham, 2000; Maurer *et al.*, 1998; Williams & Galli, 2000). Zahlreiche Untersuchungsergebnisse legen inzwischen nahe, daß sie als multifunktionale Zellen über ihr Mediatoren- und Rezeptorenprofil außerdem eine prominente Rolle bei der Regulierung der Bindegewebshomeostase spielen und Wundheilung mit Angiogeneese sowie Bindegewebsfibrosierung beeinflussen.

Bei vielfältigen fibrosierenden Prozessen in verschiedenen Organen, wie Wundheilung, Narbenhypertrophie, Sklerodermie, GVHD, rheumatoider Arthritis, Leberzirrhose, Lungenfibrose und Glomerulonephritis wurde ein Anstieg der Mastzellzahlen festgestellt (Armbrust *et al.*, 1997; Artuc *et al.*, 1999; Atkins & Clark, 1987; Claman, 1990; Gotis-Graham & McNeil,

1997; Hawkins *et al.*, 1985; Kischer *et al.*, 1978; Seibold *et al.*, 1990; Toth *et al.*, 1999; Tredget *et al.*, 1998; Yamashiro *et al.*, 1998; Yousem, 1997). In einigen Untersuchungen fanden sich nach akutem Trauma und bei chronischer Fibrosierung Hinweise für eine Degranulation der Mastzellen sowie für eine erhöhte Bereitschaft von Mastzellen, Mediatoren freizusetzen (Irani *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1988; Seibold *et al.*, 1990). Bei Sklerodermie und hypertropher Narbenbildung nach Verbrennung fanden sich erhöhte Serum-Histaminspiegel (Falanga *et al.*, 1990; Tredget *et al.*, 1998).

In den ersten 24 Stunden nach Verletzung der Haut und teilweise in den frühen Stadien fibrosierender Prozesse fällt zunächst ein weitgehendes Verschwinden der Mastzellen auf, das 1955 erstmals von Wichmann in einem Wundheilungsmodell bei der Ratte beschrieben wurde. Parallel dazu kommt es zu einem Anstieg des Histamins im Gewebe. Anschließend nehmen die Mastzellzahlen langsam zu und nähern sich nach ca 3 Wochen denen vor Verletzung bzw steigen darüberhinaus an. Das Phänomen des „Verschwindens“ von Mastzellen ergab sich bei Mastzellfärbungen mit Toluidinblau oder Avidin, die die Mastzellgranula anfärben. Elektronenmikroskopische Darstellung oder Doppelfärbungen mit Markierung der membranständigen IgE-Rezeptoren und zugleich der zytoplasmatischen Granula legten bei Sklerodermiepatienten und bei der GVHD der Maus nahe, daß Mastzellen weiterhin vorhanden waren, wenn auch weitgehend degranuliert. Claman *et al.* nannten diese Zellen deshalb „Phantommastzellen“. Bisher ist unklar, ob sie aktivierte, undifferenzierte oder unreife Mastzellen darstellen (Choi & Claman, 1987; Choi *et al.*, 1987; Claman, 1990; Claman *et al.*, 1986; Hebda *et al.*, 1993; Irani *et al.*, 1992; Nishikori *et al.*, 1998; Persinger *et al.*, 1983; Seibold *et al.*, 1990; Wichmann, 1955).

Von residenten oder eingewanderten Zellen bei chronischer Entzündung oder nach Trauma freigesetzte Mediatoren können zur Mastzelldegranulation oder -transgranulation führen, bei der über direkten Zell-Zell-Kontakt Mastzellgranula insbesondere an Endothelzellen und Fibroblasten weitergegeben werden können (Atkins & Clark, 1987; Claman, 1989; Greenberg & Burnstock, 1983). Die freigesetzten Mastzellmediatoren sind ihrerseits in vielfacher Hinsicht an Fibrosierungsprozessen und an der Wundheilung beteiligt, insbesondere durch Rekrutierung des Entzündungsinfiltrates, Neoangiogenese, Bindegewebs- und Epithelneubildung (Artuc *et al.*, 1999; Gottwald *et al.*, 1998).

Die Mastzellmediatoren LTB<sub>4</sub>, PAF, IL-8, TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF induzieren direkt oder

indirekt eine Einwanderung von Neutrophilen in das Gewebe;  $\text{TNF-}\alpha$  erhöht zusätzlich die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen (Canturk *et al.*, 1999; Möller *et al.*, 1993; Wakefield *et al.*, 1991). Histamin, Leukotriene,  $\text{PGD}_2$  und PAF wirken vasodilatatorisch und erhöhen Blutfluß und Gefäßpermeabilität für Mediatoren aus dem Serum (Atkins & Clark, 1987; Kruger-Krasagakes & Czarnetzki, 1995).

In vielen Organen, darunter der Haut, finden sich Mastzellen in enger Nachbarschaft zu Blutgefäßen. Mastzellen produzieren und sezernieren zahlreiche Mediatoren mit angiogenetischer Potenz, darunter VEGF,  $\text{TNF-}\alpha$ , Histamin, Heparin und Tryptase, so daß ein Einfluß auf die Blutgefäßneubildung bei der Wundheilung angenommen werden kann (Artuc *et al.*, 1999; Grützkau *et al.*, 1998).

Mastzellen sind selbst fähig, Typ VIII-Kollagen (humane Mastzellen), bzw. Typ IV-Kollagen (murine Mastzellen) zu sezernieren und können damit zu Angiogenese und Bindegewebsneubildung beitragen (Ruger *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 1991). Ein bedeutenderer fibrogenetischer Effekt wird allerdings von zahlreichen Mastzellmediatoren ausgelöst. Tryptase steigert die Fibroblastenproliferation und deren Kollagensynthese (s. 1.4.1.1).  $\text{TGF-}\beta$  hat gleichfalls ausgeprägte fibroproliferative Eigenschaften (s. 1.4.2.4). FGF-2 ist ein weiterer Wachstumsfaktor, der von der Mastzelle produziert wird und einen potenten mitogenen Faktor für Fibroblasten darstellt. FGF-2 fördert daneben die Kollagenaseproduktion von Fibroblasten, so daß dieser Faktor eine Rolle bei der Bindegewebshomöostase zu spielen scheint. Zusätzlich induziert FGF-2 die Angiogenese (Artuc *et al.*, 1999; Dayton *et al.*, 1989; Qu *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 1995). Neben Neutrophilen und Thrombozyten sezernieren auch Mastzellen PDGF, einen Wachstumsfaktor, der die Fibroblasten zur Produktion von Fibronektin und Hyaluronsäure sowie von Kollagen stimuliert und chemotaktisch auf Neutrophile, Makrophagen und Fibroblasten wirkt. Damit ist PDGF eine Schlüsselsubstanz bei der Bildung von Granulationsgewebe (Artuc *et al.*, 1999; Hiragun *et al.*, 1998).

Die Epithelneubildung können Mastzellen wiederum durch etliche Mediatoren beeinflussen. NGF stimuliert das Wachstum humaner Keratinozyten, die beide NGF-R exprimieren. Er erhöht ferner die Mitogenität mehrerer Wachstumsfaktoren für Keratinozyten und fördert die Produktion von VIP durch Nervenfasern, das seinerseits mitogen auf Keratinozyten wirkt (Di Marco *et al.*, 1991; Di Marco *et al.*, 1993; Haegerstrand *et al.*, 1989; Sung *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 1994). Dieser mitogene Effekt von VIP wird durch  $\text{LTB}_4$ , einem Lipidmediator

der Mastzelle, synergistisch verstärkt, wie bei der Psoriasis gezeigt wurde (Rabier *et al.*, 1993). Auch Tryptase vermag die Proliferation humaner Keratinozyten zu fördern (Cairns & Walls, 1996). IL-1, das ebenfalls von Mastzellen produziert werden kann, induziert in Fibroblasten die Synthese von Wachstumsfaktoren für Keratinozyten (Maas-Szabowski *et al.*, 1999). FGF-2 stimulierte in vitro in einer humanen Keratinozytenkultur die Migration der Keratinozyten nach Schnittverletzung und förderte beim Meerschweinchen die Epithelisierung chronischer Trommelfelldefekte (Ozkaptan *et al.*, 1997; Tsuboi *et al.*, 1992). TGF- $\beta$  scheint vor allem einen modulierenden Effekt auf wachsende humane Keratinozyten durch Beeinflussung ihrer Integrin-Rezeptoren sowie einen migrationsfördernden Effekt auf Keratinozyten in Richtung auf extrazelluläre Matrixproteine auszuüben (Zambruno *et al.*, 1995). In einer anderen Untersuchung unterdrückte TGF- $\beta$  die Keratinozytenmigration (Tsuboi *et al.*, 1992). Diese widersprüchlichen Effekte von TGF- $\beta$  können durch unterschiedliche Differenzierungsstadien der Keratinozyten oder durch unterschiedliche Kulturbedingungen entstehen. Daneben spielt TGF- $\beta$  eine Rolle bei der Differenzierung kultivierter humaner Keratinozyten (Staiano-Coico *et al.*, 1990).

Auswirkungen der Mastzellmediatoren Tryptase, Chymase, SCF, NGF, GM-CSF und TGF- $\beta$  auf Bindegewebsumbau und –wiederherstellung wurden weiter oben in detaillierterer Form bereits dargestellt.

### 1.5.2. Urtikaria und Mastzellen

Die Mastzelle gilt als Schlüsselement der Urtikaria, da ihre Mediatoren alle klinischen Symptome der Nesselsucht auszulösen vermögen. Die klassischen für Quaddeln, tiefe Ödeme, gegebenenfalls auch Blutdruckabfall sowie pulmonale und intestinale Symptome verantwortliche Substanzen sind Histamin, Neuropeptide und Lipidmediatoren, die zusammen mit weiteren Zytokinen der Mastzelle Endothelzellen aktivieren mit resultierender Einwanderung von Entzündungszellen. Entscheidend für die Aufklärung der Genese der Urtikaria ist die Identifikation der zur Degranulation führenden Mechanismen. Die gut definierte, IgE-vermittelte Aktivierung und Degranulation der Mastzelle ist nur für einen sehr geringen Anteil der akuten Urtikaria-Fälle verantwortlich (0,9 %), eine größere Rolle spielen Infekte der oberen Luftwege (ca 39 %) und Medikamentenunverträglichkeit (ca 9 %). Bei der chronischen Urtikaria stehen als Auslöser Pseudoallergien auf Nahrungsmittel und seltener auch chronische Entzün-

dungen des Gastrointestinaltraktes im Vordergrund. Als Stimuli für die nicht-IgE-vermittelte Mastzelldegranulation kommen Komplement und Neuropeptide in Betracht (Henz & Zuberbier, 1998; Henz & Zuberbier, 2000). Auch eine autoimmune Genese durch IgG-anti-IgE-Antikörper wird in einem Teil der Fälle diskutiert (Greaves, 1992).

Welche Rolle die zahlreichen von der Mastzelle exprimierten und sezernierten Zytokine bei der Urtikaria spielen, ist weitgehend ungeklärt. In vitro stimulierte HMC-1-Zellen können IL-1  $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, SCF, GM-CSF, TNF- $\beta$  und PDGF exprimieren (Möller *et al.*, 1998; Möller *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1995; Welker *et al.*, 1999). Untersuchungen der Zytokinexpression von humanen Mastzellen wurden bei allergischen Reaktionen von Haut und Schleimhäuten im Rahmen der Atopie durchgeführt und die Mastzelle als Quelle für IL-4, -5, -6, GM-CSF und TNF- $\alpha$  identifiziert, die z.T. bei allergischer Entzündung hochreguliert waren (Bradding *et al.*, 1994; Horsmanheimo *et al.*, 1994; Okayama *et al.*, 1998; Pawankar & Ra, 1996). Humane Mastzellen scheinen nicht nur bezüglich des Gehalts an Tryptase und Chymase heterogen zu sein, sondern auch hinsichtlich des Zytokinprofils. IL-4 wurde bevorzugt von MCTC, die sich unter normalen Bedingungen überwiegend in der Haut finden, exprimiert, IL-5 und IL-6 hingegen fast ausschließlich von MCT (Bradding *et al.*, 1995b). IgE-medierte und IgE-unabhängige Stimulation, ebenso wie eine Variation der Kulturbedingungen, führten bei humanen intestinalen Mastzellen zur Expression unterschiedlicher Zytokingruppen. IL-3, IL-5, IL-9 und IL-13 wurden nach IgE-vermittelter Mastzellaktivierung exprimiert, und in der Kultur mit IL-4 und SCF zeigte sich ein vierfacher Anstieg der Produktion von IL-3, IL-5, and IL-13 im Vergleich zur Kultur mit SCF allein. Dieses Zytokinmuster entspricht einer Th2-Antwort im Gegensatz zu dem proinflammatorischen Zytokinmuster, das nach bakterieller Aktivierung der Mastzelle auftrat (Lorentz *et al.*, 2000). Auch an peritonealen Mastzellen der Ratte wurde gezeigt, daß das Spektrum der freigesetzten Mediatoren stimulusabhängig ist (Gupta *et al.*, 1996; Leal-Berumen *et al.*, 1994).

Sowohl bei der akuten, als auch bei der chronischen und physikalischen Urtikaria wurde eine Mastzellvermehrung um den Faktor 2,4 in der gesamten Dermis nachgewiesen (Haas *et al.*, 1998b). Hautbiopsien der neutrophilen Urtikaria, einer histologisch definierten Untergruppe der Urtikaria mit ausgeprägtem neutrophilenreichem Entzündungsinfiltrat, zeigten vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-3, jedoch nicht von IL-8 (Toppe *et al.*, 1998). In Quaddeln wurden erhöhte IL-6-Spiegel sowie vermehrte Expression des Migrationsinhibitionsfaktors nachgewiesen (Czarnetzki *et al.*, 1989; Lawlor *et al.*, 1993). Die aus den Mastzellen im Rah-



men der Urtikaria freigesetzten Mediatoren führen zu einer sequentiellen Hochregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1, sowie von  $\beta$ 2-Integrinen auf Leukozyten und von Molekülen der MHC-Klasse II (Barlow *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1995b; Haas *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 1998a). Auch die Eosinophilenproteine MBP und ECP finden sich in Quaddeln und zum Teil in nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten (Haas *et al.*, 1995c). P-Selektin wurde vermehrt in der Haut und im Serum von Patienten mit chronisch-rezidivierender Urtikaria und Urticaria factitia nachgewiesen (s.auch 1.4.2.5), und eine ausgeprägte Zunahme von TNF $\alpha$  im Serum wurde bei anstrengungsinduzierter Urticariavaskulitis festgestellt (Kano *et al.*, 1998; Zuberbier *et al.*, 1997). Diese Befunde unterstreichen, daß die Urtikaria ein generalisiertes Geschehen mit zahlreichen Akteuren darstellt, unter denen die Mastzelle eine zentrale Rolle einnimmt.

## 2. Fragestellungen

Diese Darstellung der vielfältigen Funktionen von Mastzellmediatoren bei der Wundheilung und Fibrosierung zeigt, daß Mastzellen potentiell alle Phasen dieser Prozesse regulieren und beeinflussen können. Die meisten bisherigen Ergebnisse stammen allerdings aus In vitro-Untersuchungen oder Studien an Tiermodellen und müssen durch komplexere Organkulturmodelle und In vivo-Daten ergänzt werden. Wir haben daher humanes Narbengewebe im Vergleich mit gesunder Haut untersucht, um folgende Fragenkomplexe zu beantworten:

Ändern sich Mastzellzahl sowie das Verhältnis von MCT zu MCTC in humanem Narbengewebe im Vergleich zu gesunder Haut? Unterscheiden sich die Mastzellzahlen in Narben je nach Färbemethode? Falls ja, welche Rückschlüsse ergeben sich daraus?

Im Rahmen von fibrosierenden Prozessen und bei der Wundheilung wird eine Mastzelldegranulation beschrieben. Zeigt infolgedessen Narbengewebe einen unterschiedlichen Gehalt an den Mastzellproteasen Tryptase und Chymase im Vergleich zu normaler Haut? Könnten die aus Mastzellen freigesetzten Proteasen bei Bindegewebsumbau und -wiederherstellung beteiligt sein? Spezifischer - zeigen Tryptase und Chymase eine mitogene Wirkung auf Keratinozyten und Fibroblasten?

Welche Änderungen ergeben sich bezüglich der Expression weiterer wundheilungsfördernder sowie chemotaktischer und Mastzellwachstums-Faktoren und derer Rezeptoren (SCF und SCF-Rezeptor, NGF und NGF-Rezeptoren, GM-CSF und GM-CSF-Rezeptor sowie TGF- $\beta$  und TGF- $\beta$ -Rezeptor) in humanem Narbengewebe im Vergleich zu normaler Haut? Wie lassen sich mögliche Änderungen im Rahmen von Wundheilung und Fibrosierung interpretieren? Welche Interaktionen ergeben sich?

Obwohl Mastzellen bei der Urtikaria und bei der Mastozytose in noch größerer Zahl vorliegen können als bei der Wundheilung oder in Narbengewebe und zum Teil gleichfalls degranuliert sind, finden sich vergleichbare Effekte auf Blutgefäße, Bindegewebe oder Keratinozyten nicht. Offenbar spielt das unterschiedliche Mikromilieu bei der Art der Stimulation eine entscheidende Rolle.

Mit der Frage nach Unterschieden im Expressionsmuster bei den beiden Krankheiten als Beispiel für unterschiedliche, mit Mastzellvermehrung assoziierte pathologische Veränderungen haben wir folgende im Narbengewebe untersuchte Zytokine und Rezeptoren auch in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten untersucht: SCF und SCF-Rezeptor, NGF und NGF-Rezeptoren, GM-CSF und GM-CSF-Rezeptor.

Zusätzlich haben wir die kutane Expression von drei Zytokinen (IL-3, IL-8, TNF- $\alpha$ ), die von stimulierten Mastzellen in größerer Menge freigesetzt werden, in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten untersucht, da sie aufgrund ihrer ausgeprägten proentzündlichen und chemotaktischen Eigenschaften eine Rolle bei der Pathogenese der Urtikaria spielen könnten.

### 3. Untersuchungsmethoden

#### 3.1. Gewebe

Für die immunhistochemischen Untersuchungen zur Wundheilung und Narbenbildung wurde Narbengewebe von Patienten verwendet, bei denen Nachexzisionen im Rahmen einer Melanombehandlung oder zu diagnostischen Zwecken durchgeführt wurden (N = 20). Das Narbenalter lag zwischen 5 und 369 Tagen. 7 Narben wiesen ein Alter von  $\leq 35$  Tagen auf und wurden als frische Narben eingeordnet gegenüber 13 alten Narben mit einer Bestandsdauer von  $> 35$  bis 369 Tagen. Die Hautexzisate wurden in Lokalanästhesie von Stamm oder Extremitäten entnommen. Als Kontrolle diente normale Haut, die im Rahmen kosmetischer Operationen gewonnen wurde (N = 10).

Die Bestimmung der Proteaseaktivitäten sowie die PT-PCR erfolgte an Narbengewebe sowie normaler Haut (mindestens 8 cm von der Narbe entfernt) von 7 weiteren Patienten. Hier lag das Narbenalter zwischen 23 und 56 Tagen.

Für die immunhistochemischen Studien von läSIONalem und nicht-läSIONalem Urtikariagewebe wurden Biopsien von 9 Patienten mit akuter Urtikaria, von 10 Patienten mit chronisch-rezidivierender Urtikaria, von 6 Patienten mit verzögerter Druckurtikaria, von 1 Patienten mit Kälteurtikaria (sequentielle Biopsien 5, 15 und 30 Minuten nach Quaddelprovokation durch einen Eiswürfel) sowie von 7 nicht-atopischen Personen mit positiver Reaktion auf Hausstaubmilbenantigen im Pricktest entnommen (15 Minuten nach Allergenapplikation). Antihistaminika waren mindestens während der 3 vorausgegangenen Tage, systemische Steroide mindestens während der 3 vorausgegangenen Wochen nicht verwendet worden. Als Kontrolle diente wiederum normale, bei kosmetischen Operationen gewonnene Haut (N = 10).

Die Biopsien wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend tiefgefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Alle Patienten hatten den Biopsien nach entsprechender Aufklärung zugestimmt.

### 3.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten an Gefrierschnitten mittels der in der Arbeitsgruppe etablierten APAAP-Technik (Schadendorf *et al.*, 1991). In Tabelle 1 sind die verwendeten Antikörper aufgelistet.

**Tabelle 1:** Monoklonale Antikörper für die APAAP-Färbungen

monoklonaler AK	Subklasse	Spezifität	Quelle
anti-SCF	IgG1	SCF	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
YB5.B8	IgG1	c-Kit (CD 117)	L.K.Ashman, Adelaide, Australien
anti-NGF	IgG1	NGF	Santa Cruz Biotechnology
anti-NGF-R-TrkA	IgG1	NGF-R TrkA	Santa Cruz Biotechnology
anti-NGF-R, human	IgG1	humaner NGF-R p75	Boehringer, Mannheim
anti-GM-CSF	IgG1	GM-CSF	Santa Cruz Biotechnology
Monoclonal mouse anti-human GM-CSF-R (CDw116)	IgG2a	$\alpha$ -Kette des huma- nen GM-CSF-R	Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA
anti-TGF- $\beta$ 1	IgG1	TGF- $\beta$ 1	Santa Cruz Biotechnology
anti-TGF- $\beta$ -R I	IgG1	TGF- $\beta$ -R Typ I	Santa Cruz Biotechnology
anti-TGF- $\beta$ -R II	IgG1	TGF- $\beta$ -R Typ II	Santa Cruz Biotechnology
TA 99		Melanosomen	L.J.Olds, New York, USA
Anti-human desmin	IgG1	Desmin	DAKO, Dänemark
Anti-human IL-3 monoclonal antibody	IgG1	IL-3	Genzyme
Anti-human TNF- $\alpha$ rabbit poly- clonal antibody	IgG and IgM	TNF- $\alpha$	Genzyme
Anti-human IL-8 monoclonal antibody 52E8	IgG1	IL-8	M. Sticherling, Kiel
AA1	IgG1	Tryptase	A. Walls, Southampton, Groß- britannien
UCHL1	IgG2a	T-Zellen	DAKO
IgG2a (mouse) isotypic control	IgG2a		Immunotech, Marseille, Frank- reich

### 3.3. Enzymhistochemische sequentielle Doppelfärbung

Die Tryptase- und Chymasefärbungen erfolgten an Gefrierschnitten mittels enzymespezifischer chromogener Substrate (Algermissen *et al.*, 1994; Harvima *et al.*, 1990). Als Substrat für Tryptase wurde Z-Gly-Pro-Arg-MNA (40mM) (Bachem, Bubendorf, Schweiz) verwendet unter Zusatz von  $\alpha$ 1-Antitrypsin (Sigma, St. Louis, USA) zur Inhibition von Chymase und als Substrat für Chymase Suc-Val-Pro-Phe-MNA (Bachem) mit Zugabe von Aprotinin (Sigma) zur Blockierung der Chymase-ähnlichen Aktivität von Cathepsin G. MCTC wurden orange-braun, MCT dunkelblau angefärbt. Dieselben Schnitte wurden sequentiell angefärbt und hinsichtlich der Zahl von MCT und MCTC quantitativ ausgewertet (Algermissen *et al.*, 1994).

### 3.4. Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Zur Identifizierung von Mastzellrezeptoren wurden Doppelfärbungen mit Fluoreszein (DTFA)-konjugiertem Eiweißavidin (Jackson Immuno Research Laboratories, West Baltimore, USA) und mit den jeweiligen primären Antikörpern (s. Tab. 2) für den ersten Schritt der APAAP-Reaktion durchgeführt (Haas *et al.*, 1995a). Anschließend wurde ein Fluorochrom-konjugierter Antikörper (Cy3TM-conjugated AffiniPureF(ab)2 Fragment Goat Anti-Mouse IgG(H+L), Jackson Immuno Research Laboratories, West Baltimore, USA) als Sekundärantikörper eingesetzt.

**Tabelle 2:** Monoklonale Antikörper für die Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Monoklonale Antikörper	Titer
YB5.B8	1 : 5000
Anti-human GM-CSF-Receptor (CD w 116)	1 : 300
Anti-Nerve Growth-Factor-Receptor, human (anti-p75)	1 : 500
Cy3TM-conjugated AffiniPureF(ab)2 Fragment Goat Anti-Mouse IgG	1 : 700

### 3.5. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Mastzellproteasen

Die Enzymaktivität der Mastzellproteasen wurde in homogenisierten Hautbiopsien gemessen. Trypsase wurde durch Spaltung des Peptids Z-Gly-Pro-Arg-pNA (4mM) unter Zusatz von Heparin (5 mg pro ml) und  $\alpha$ -1-Antitrypsin (2 mg pro ml) zur Hemmung anderer Enzyme mit trypsinähnlicher Aktivität bestimmt, Chymase durch Spaltung von Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (2mM) in Gegenwart von Aprotinin (0,5 mg pro ml) als Inhibitor unspezifischer chymotrypsinähnlicher Aktivität durch Cathepsin G (alle verwendeten Substrate und Substanzen von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (Harvima *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1987). Die enzymatische Aktivität wurde als mU pro mg Protein ausgedrückt nach Anpassung der Werte an den spektrometrisch (280 - 260 nm) ermittelten Proteingehalt der Homogenate.

### 3.6. Bestimmung der mitogenen Wirkung von Mastzellproteasen auf Fibroblasten und Keratinozyten

Murine 3T3 Swiss Albino-Fibroblasten (Passagen 98-113; ICN, Meckenheim, Schweiz), bovine Thymozyten (Becton Dickinson, Basel, Schweiz) und HaCaT Keratinozyten (interne Passagen 15-32; dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von N. Fusenig, Heidelberg, Deutschland) wurden in DMEM (GIBCO, Basel, Schweiz) mit 5 % FCS und Antibiotika supplementiert und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert mit wöchentlichen Passagen.

Nach Trypsinisierung mit EDTA wurden die Zellen geerntet und bei einer Dichte von 10 000 Keratinozyten oder 5000 Fibroblasten / ml supplementiertes Kulturmedium über 3 Tage in Lochplatten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über 3 Tage in serumfreiem Medium bei einer Konfluenz von 40 - 60 % kultiviert, um sie in ein Ruhestadium zu versetzen. 23 Stunden nach Zugabe der Testsubstanzen [humane Lungentryptase, EGF, TGF- $\alpha$  (alle von ICN),  $\alpha$ -Thrombin, Trypsin und Chymotrypsin (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Chymase aus Haut von Moro-Mäusen (Algermissen, 1994) ] wurden die Zellen mit 300  $\mu$ l Trypsin-EDTA (Keratinozyten) oder 250  $\mu$ l EDTA mit 1% Glukose und 50  $\mu$ l Trypsin-EDTA (Fibroblasten) in Suspension gebracht. Als Inkubationsperiode wurden 23 Stunden gewählt, da nach diesem Intervall eine optimale Verteilung der rekrutierten Zellen in der S+G<sub>2</sub>M-Phase vorlag.

Für die anschließende FACS-Analyse wurden 50 µl einer 1% RNase-Lösung, 1% Trypsininhibitorlösung, 150 µl Propidiumjodid und 20 µl 0.1% Triton x (alle von Sigma) in jedes Kulturloch gegeben. Den Keratinozyten wurden 40 µl bovine Thymocyten (1000 Zellen / ml) als interne Kontrolle beigelegt. Die Zellen wurden durch Nylonfilter mit einer Porengröße von 45 µm passiert, hinsichtlich der Anfärbung ihrer Kerne mit Propidiumjodid überprüft und der DNA-Gehalt mit einem FACS-STAR<sup>PLUS</sup>-Gerät (Becton Dickinson) analysiert. Die mitogene Wirkung wurde aus dem Verhältnis des Prozentsatzes von Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase zu dem von Zellen in der S+G<sub>2</sub>M-Phase mit einem Computerprogramm berechnet.

### 3.7. Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion

Die Biopsien wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert und lysiert. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy-total-RNA-kit (Quiagen, Hilden) präpariert. Mit einem cDNA-Synthese-Kit (InVitrogen, Stade) wurde über reverse Transkription von 5 µg Gesamt-RNA cDNA synthetisiert. Die Amplifikation von cDNA erfolgte mit den folgenden Primern [Wo nicht anders angegeben, mögen Details zur Herkunft der Primer den folgenden Arbeiten entnommen werden: (Hermes *et al.*, 2000; Welker *et al.*, 1999; Welker *et al.*, 2000a) ]:

**GAPDH:** 5'GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG und 5'GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC (197 bp),

**Tryptase:** 5'GGA GCT GGA GGA GCC CGT GA und 5'ACC TGG GTA AGG AAG CAG TGG TG (531 bp),

**Chymase:** 5'AAG GAG AAA GCC AGC CTG ACC und 5'TCC GAC CGT CCA TAG GAT ACG (321 bp),

**SCF:** 5'GGG CTG GAT CGC AGC GC und 5'CTC CAC AAG GTC ATC CAC (Longley *et al.*, 1993),

**c-Kit:** 5'CGT TGA CTA TCA GTT CAG CGA G und 5'CTA GGA ATG TGT AAG TGC CTC C (369 bp),

**NGF:** 5' TCA TCA TCC CAT CCC ATC TTC CAC und 5' CAC AGC CTT CCT GCT GAG CAC ACA (348 bp) (Tam *et al.*, 1997),

**NGFR-p75:** 5'TGA GTG CTG CAA AGC CTG CAA und 5'TCT CAT CCT GGT AGT AGC CGT (230 bp),

**NGFR-TrkA:** 5'GGC TCC TCG GGA CTG CGA TG und 5'CAG GAG AGA GAC TCC AGA GCG (260 bp),



**GM-CSF:** 5'ACA CTG CTG AGA TGA ATG AAA CAG TAG und 5' TGG ACT GGC TCC CAG CAG TCA AAG GGG ATG (285 bp; Stratagene, Heidelberg);

**GM-CSFR:** CTT CTC TCT GAC CAG CA und 5' ACA TGG GTT CCT GAG TC (530 bp) (Guillaume *et al.*, 1993),

**TGF $\beta$ 1:** 5' CGG GGC GAC GAC CTG GGC ACC ATG CAT GAC und 5' CTG CTC CAC CTT CCC CTT GCG ACC CAC (187 bp) (Stratagene),

**TGF $\beta$ R1:** 5' TAG CTG AAA TTG ACC TAA TTC CTC G und 5' TGC GGT TAT GGC AGA TAT AGA CC (310 bp) (Suzuki *et al.*, 1994),

**TGF $\beta$ R2:** 5' AGA CTG ACT TGC GAC AAC CAG und 5' GAC TGC TGG TGG TGT ATT CTT CCG (250 bp) (Lawler *et al.*, 1994),

Mittels taq-Polymerase (GIBCO) wurde die Amplifikation mit einem automatischen Temperaturzyklusgerät (Perkin Elmer, Weiterstadt) über 24 - 40 Zyklen durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus folgenden Teilschritten: Denaturation bei 94°C, Abkühlung und Hybridisierung bei 56°C sowie Extension bei 72 °C, jeweils über eine Minute. Für die semiquantitative PCR wurde die cDNA aus den verschiedenen Geweben durch serielle Verdünnungsschritte auf die gleiche Menge justiert. Das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen diente als Kontrolle (Grabbe *et al.*, 1996; Hermes *et al.*, 2000). Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese nach enzymatischer Verdauung mittels Standardtechniken. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt, und die Färbeintensität der Banden wurde densitometrisch mit Hilfe eines Videoscanners und der Software ScanPack 3.0 (Biometra, Göttingen) bestimmt.

### 3.8. FACS-Analyse von Mastzellen

Mastzellen wurden aus Hautexzisaten (normale Haut) mittels enzymatischem Abbau in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten isoliert und anschließend mit einem magnetischen Zellsortierer unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers YB5.B8 (L.K.Ashman, Adelaide, Australien) weiter aufgereinigt. Durch die Toluidinblaufärbung konnte ein Reinheitsgrad von 95 % bestätigt werden. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit Maus-IgG inhibiert und bei 4°C über 30 Minuten mit dem Antikörper in 100  $\mu$ l PBS (mit/ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, 2% FCS) inkubiert, anschließend mit einem Fluoreszein-konjugierten Sekundärantikörper markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (Lippert *et al.*, 1998).

### 3.9. Mikroskopische Auswertung

Die Schnittpräparate der immunhistochemischen Studien von Narbengewebe versus normale Haut wurden bei 400facher Vergrößerung ausgewertet unter Verwendung eines Netzmikrometers ( $0,0625 \text{ mm}^2$  pro Gitterfeld). Zellen in der Epidermis wurden jeweils über  $0,0625 \text{ mm}$  ausgezählt. Hinsichtlich der Dermis wurden obere Dermis (bis  $0,0625 \text{ mm}$  unterhalb der Basalmembran = 1 Gitterfeld), mittlere Dermis (basal angrenzende  $0,1250 \text{ mm}$  = 2 Gitterfelder) und untere Dermis (basal angrenzende Dermis bis Subcutis) unterschieden. In allen Präparaten war der Tiefendurchmesser der Dermis ausreichend für diese Unterteilung. Die angegebenen Zellzahlen beziehen sich jeweils auf  $0,0625 \text{ mm}^2$ .

Bei der enzymhistochemischen sequentiellen Doppelfärbung wurden zunächst die mit der Chymasefärbung identifizierten MCTC jeweils ausgezählt und fotografiert, danach in denselben Schnitten und Gesichtsfeldern die durch die Tryptasefärbung dargestellten MCT.

Die Avidin-APAAP-doppelgefärbten Schnitte wurden bei 1000facher Vergrößerung in Ölimmersion mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop HB050, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet und fotografiert (Zeiss-Mikroskop-Kamera MC80). Das Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm) diente zur Darstellung der avidingefärbten Mastzellen, die grün erschienen, das Filterset 15 (Exzitation 546/12) zur Identifikation der rot angefärbten Zytokinrezeptoren in jeweils denselben Gesichtsfeldern.

Auch die Urtikariabiopsien im Vergleich zu normaler Haut wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen bei 400facher Vergrößerung ausgewertet für folgende Kompartimente der Haut: Epidermis, dermale perivaskuläre Zellen, dermale Endothelzellen, letztere beide jeweils unterteilt nach oberer und unterer Dermis. Die angegebenen Zahlen bedeuten jeweils angefärbte Zellen pro Mikroskopausschnitt bei 400facher Vergrößerung (HPF).

Für die Identifizierung von Zytokinrezeptoren auf Mastzellen wurden Serienschnitte mit Tryptase und dem jeweiligen Zytokin angefärbt. Jeweils 50 - 100 Mastzellen wurden pro Biopsie hinsichtlich einer Zytokinexpression ausgewertet.

### 3.10. Statistische Auswertung

Hinsichtlich der immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse erfolgt die Angabe der Zellzahlen jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung ( $MW \pm SD$ ). Statistische Signifikanz der immunhistochemischen Untersuchungen von Narbengewebe im Vergleich zu normaler Haut wurde mit dem Mann-Whitney U-Test ermittelt. Für die mRNA-Bestimmung wurde statistische Signifikanz mit dem ungepaarten zweiseitigen Student t-Test untersucht. Der Wilcoxon-Rank-Test diente zur Korrelation von immunhistochemischen Ergebnissen und Narbenalter. Die statistische Auswertung erfolgte zum Teil mit der Unterstützung des Instituts für Medizinische Statistik und Informationsverarbeitung der Freien Universität.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen der Urtikariagewebe im Vergleich zu normaler Haut wurde statistische Signifikanz mit dem Student t-Test bei ungepaarten Proben ermittelt, mit dem gepaarten Student t-Test beim Vergleich zwischen läsionaler und nichtläsionaler Haut jeweils derselben Urtikariapatienten. Der Wilcoxon-Rank-Test diente der Ermittlung einer möglichen Korrelation zwischen Mastzellzahlen und Zytokinreaktivität in den Biopsien.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Mastzellen in Narbengewebe

#### 4.1.1. MCTC und MCT

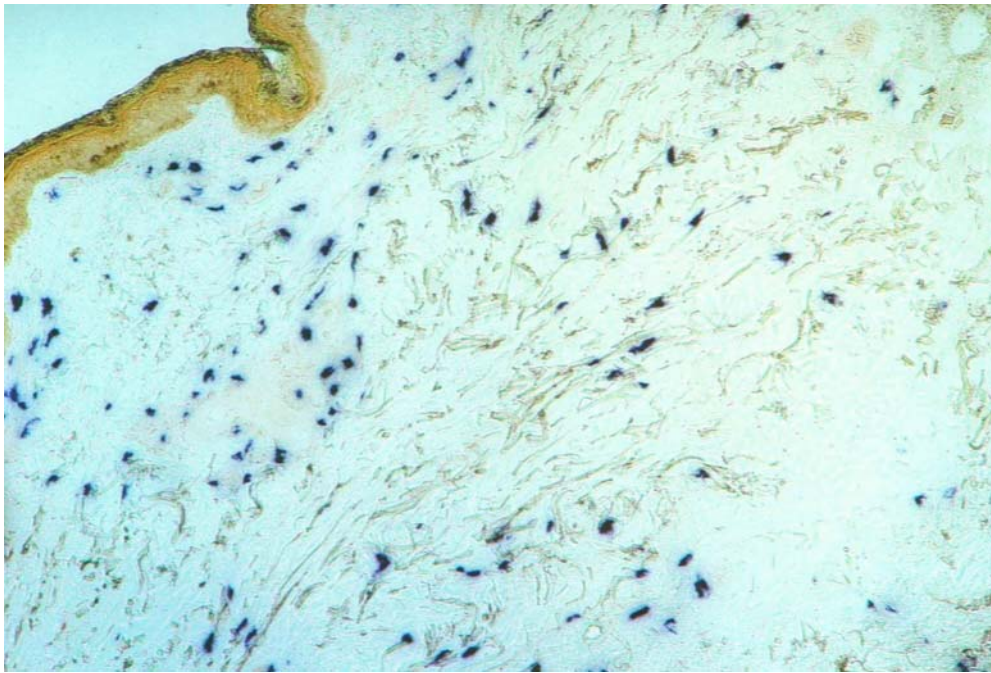
In der normalen Haut fanden sich MCTC und MCT im gesamten Korium mit bevorzugter Gruppierung um Gefäße und um Hautanhangsgebilde (Abb. 1, S. 45). MCT zeigten eine kontinuierliche Abnahme vom oberen zum unteren Korium (Tab.3).

In Narbengewebe waren zum Teil (N = 6) keine, in den übrigen Narben nur vereinzelt MCTC sichtbar, die kleiner und schwächer angefärbt als MCTC in normaler Haut wirkten (Abb. 2, S. 46). Unauffällige MCTC fanden sich in an das Narbengewebe angrenzender normaler Haut, so daß ein technischer Fehler bei der Färbung ausgeschlossen werden konnte. Die Verminderung der Anzahl von MCTC in Narben gegenüber normaler Haut war in allen drei Koriumlagen hochsignifikant ( $p < 0,0001$ , siehe Tab. 3). Das Narbenalter ( $<$  oder  $>$  35 Tage) hatte keinen Einfluß auf die Anzahl von MCTC (Abb. 3, S. 47).

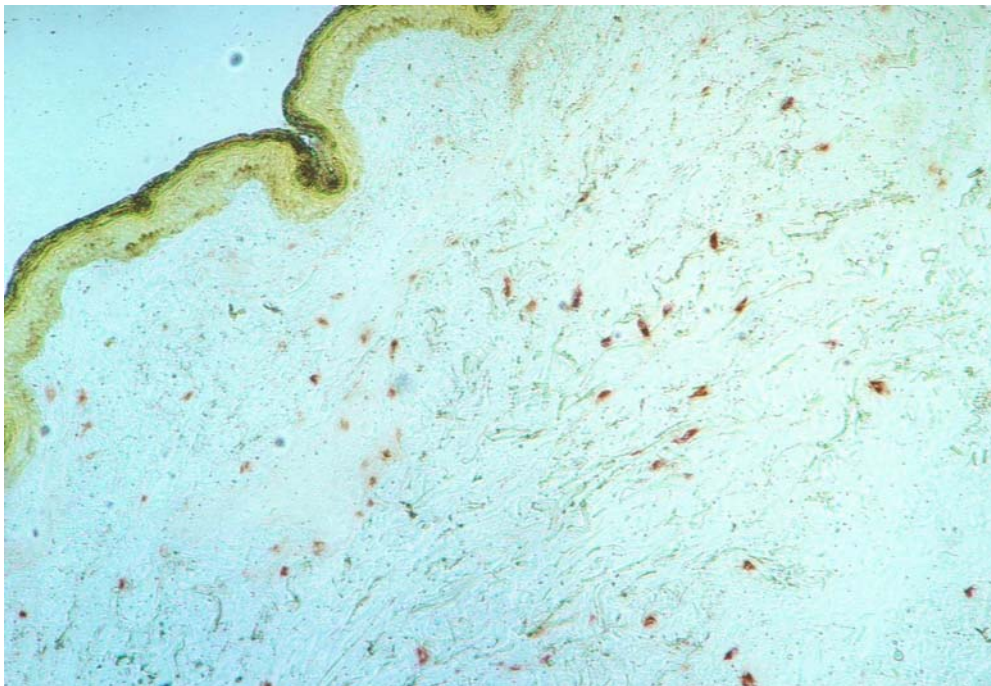
**Tabelle 3:** Chymase- und tryptasehaltige Mastzellen sowie c-Kit-positive Zellen in normaler Haut und Narbengewebe. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro  $0,0625 \text{ mm}^2 \pm \text{SD}$  dar.

	MCTC	MCT	c-Kit-positive Zellen
<b>Normale Haut (N = 10)</b>			
obere Dermis	$2,77 \pm 0,62$	$5,22 \pm 1,03$	$5,14 \pm 0,96$
mittlere Dermis	$3,04 \pm 0,78$	$3,30 \pm 0,98$	$2,55 \pm 0,89$
untere Dermis	$2,13 \pm 0,63$	$2,06 \pm 0,86$	$1,45 \pm 0,58$
<b>Narben (N = 20)</b>			
obere Dermis	$0,26 \pm 0,16^{***}$	$5,85 \pm 1,03$	$6,99 \pm 1,08$
mittlere Dermis	$0,39 \pm 0,22^{***}$	$4,33 \pm 1,21$	$5,74 \pm 1,09^*$
untere Dermis	$0,28 \pm 0,17^{***}$	$2,14 \pm 0,63$	$2,94 \pm 0,64^{**}$

\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,026$ , \*  $p < 0,041$  im Vergleich zu normaler Haut.



(A)



(B)

**Abb. 1:** Darstellung der MCT (A) und MCTC (B) in normaler Haut mittels enzymhistochemischer sequentieller Doppelfärbung (jeweils x 100).

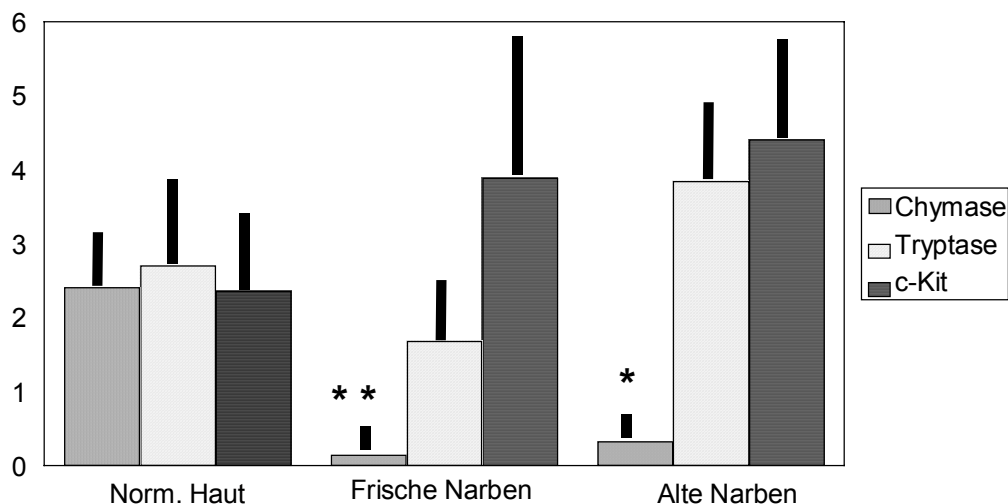




**Abb. 2:** Narbangewebe mit weitgehendem Fehlen von MCTC in der enzymhistochemischen Färbung (x 200)

Auch MCT waren in Narben im Vergleich zur gesunden Haut kleiner mit jeweils aufgehelltem Zentrum. Jedoch fand sich kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl der MCT zwischen Narben und normaler Haut (Tab. 3, S. 44). Wie in normaler Haut nahmen die MCT in Narbangewebe von der oberen zur unteren Dermis ab, unabhängig vom Narbenalter. In alten Narben fanden sich mehr MCT als in frischen Narben (Abb. 3, S. 47). Der Unterschied zwischen den Zellzahlen war im unteren Korium signifikant bei  $p < 0,032$ .

Alle Hautmastzellen enthalten Tryptase, und unter normalen Bedingungen enthalten ca 88 % der Hautmastzellen zusätzlich auch Chymase, wie sich durch unsere Untersuchungen mit einem Verhältnis von 89 % MCTC zu 11 % MCT bestätigen ließ (siehe 1.4.1.3 und Tab. 4, S. 47). In Narbangewebe zeigte sich bei signifikanter Abnahme von MCTC eine Umkehrung dieses Verhältnisses mit 9 % MCTC zu 91 % MCT, und zwar sowohl in frischen als auch in alten Narben (Tab. 4, S.47).



**Abb. 3:** Chymase- und tryptasehaltige Mastzellen sowie c-Kit-positive Zellen in der Dermis von normaler Haut im Vergleich zu frischen und alten Narben. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW  $\pm$  SD pro 0,0625 mm<sup>2</sup> dar.

\*\* p < 0,001, \* p < 0,05 im Vergleich zu normaler Haut.

**Tabelle 4:** Anzahl der jeweils unterschiedlich gefärbten Mastzellen in normaler Haut (gesamte Dermis) im Vergleich zu Narbengewebe und Verhältnis von MCTC und MCT in Prozent. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW  $\pm$  SD pro 0,0625 mm<sup>2</sup> dar.

Mastzellen	normale Haut (Dermis)	Narben (Dermis)
MCTC	2,41 $\pm$ 0,67	0,28 $\pm$ 0,17
MCT	2,71 $\pm$ 0,96	3,14 $\pm$ 0,97
SCF-R-positive Zellen	2,36 $\pm$ 0,86	4,28 $\pm$ 0,93
MCTC : MCT	89% : 11%	9% : 91%

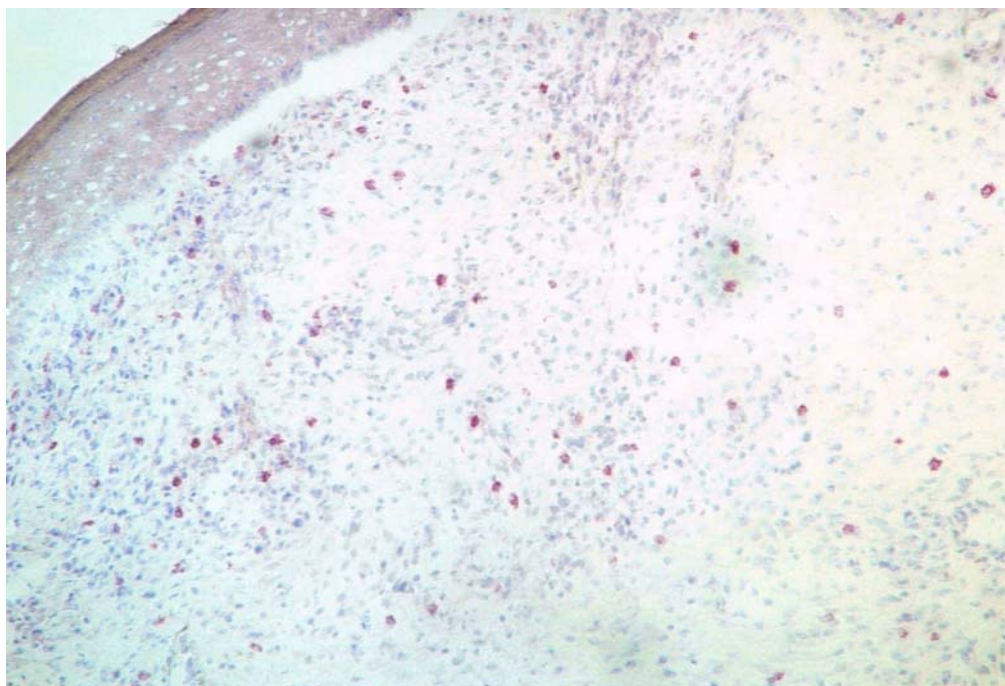
#### 4.1.2. c-Kit-positive Mastzellen

Physiologischerweise wird c-Kit in der Haut nur von Mastzellen und Melanozyten exprimiert. Da Melanozyten normalerweise epidermal lokalisiert sind, handelt es sich bei den dermalen c-Kit-positiven Zellen ausschließlich um Mastzellen, so daß sich c-Kit als ein idealer membranständiger Mastzellmarker erweist, der auch nach Degranulation der Zelle diese als Mastzelle identifizieren kann im Gegensatz zu den Mastzellfärbungen, die auf Bindung der Farbstoffe an Bestandteile der Granula beruhen (Toluidinblau, Avidin). Die in anderen Untersuchungen gewählte Identifizierung von Mastzellen mittels Markierung des hochaffinen IgE-Rezeptors FcεRI muß als weniger spezifisch betrachtet werden, da auch weitere dermale Zellen, z.B. Monozyten, Makrophagen und dermale dendritische Zellen, diesen Rezeptor exprimieren können (Haas *et al.*, 1992; Maurer *et al.*, 1994).

Im Korium normaler Haut fanden sich c-Kit-positive Zellen gleichmäßig disseminiert und perivaskulär sowie perifollikulär gehäuft mit abnehmender Tendenz von der oberen zur unteren Dermis. Narbengewebe zeigte in der Dermis eine relativ gleichmäßige Verteilung c-Kit-positiver Zellen, deren Zahl sich ebenfalls nach unten hin verringerte (Abb. 4, S. 49). Im Vergleich zur normalen Haut war die Zahl c-Kit-exprimierender Zellen in allen Koriumetagen höher. Der Unterschied erreichte Signifikanz in der mittleren ( $p < 0,041$ ) und in der unteren Dermis ( $p < 0,026$ ; siehe Tab. 3, S. 44). In den älteren Narben fanden sich im tiefen Korium signifikant mehr SCF-R-positive Zellen als in den frischen Narben ( $p < 0,024$ ). Zum Ausschluß von dermalen Melanozyten erfolgte eine Färbung mit dem Melanosomenmarker TA99, der keinerlei dermale Zelle in normaler Haut oder in Narben markierte.

Erwartungsgemäß markierte der monoklonale Antikörper YB5.B8 gegen c-Kit in der normalen Haut Zellen innerhalb der Basalzellschicht der Epidermis, die den Melanozyten entsprechen (Dippel *et al.*, 1995). In jüngeren und alten Narben gleichermaßen fehlte eine epidermale c-Kit-Expression weitgehend mit hochsignifikantem Unterschied zur normalen Haut ( $p < 0,0001$ ). Der Melanosomenmarker TA99 färbte eine ähnliche Anzahl von Zellen in der epidermalen Basalzellschicht normaler Haut wie der c-Kit-Antikörper YB5.B8. Im Gegensatz zu den c-Kit-positiven epidermalen Zellen zeigten TA99-markierte Zellen jedoch keine Abnahme in der Epidermis von Narbengewebe (Tab. 5, S. 49). Hierbei könnte eine selektive Herunterregulation der melanozytären c-Kit-Expression in Narbengewebe eine Rolle spielen.





**Abb. 4:** Narbangewebe mit zahlreichen c-Kit-positiven Mastzellen (APAAP-Färbung mit dem c-Kit-Antikörper YB5.B8; x 100)

**Tabelle 5:** Immunreaktivität basaler Epidermiszellen mit den Antikörpern YB5.B8 gegen c-Kit und TA99 gegen Melanosomen. Zahlen entsprechen MW der markierten Zellen pro 0,0625 mm Epidermislänge  $\pm$  SD.

	YB5.B8	TA99
Normale Haut	15,45 $\pm$ 2,29	19,38 $\pm$ 9,77
Narben	2,39 $\pm$ 0,63*	20,17 $\pm$ 5,46

\*  $p < 0,0001$  im Vergleich zu normaler Haut.

#### 4.1.3. Pathophysiologische Bedeutung von Mastzellsubtypen in Narbangewebe

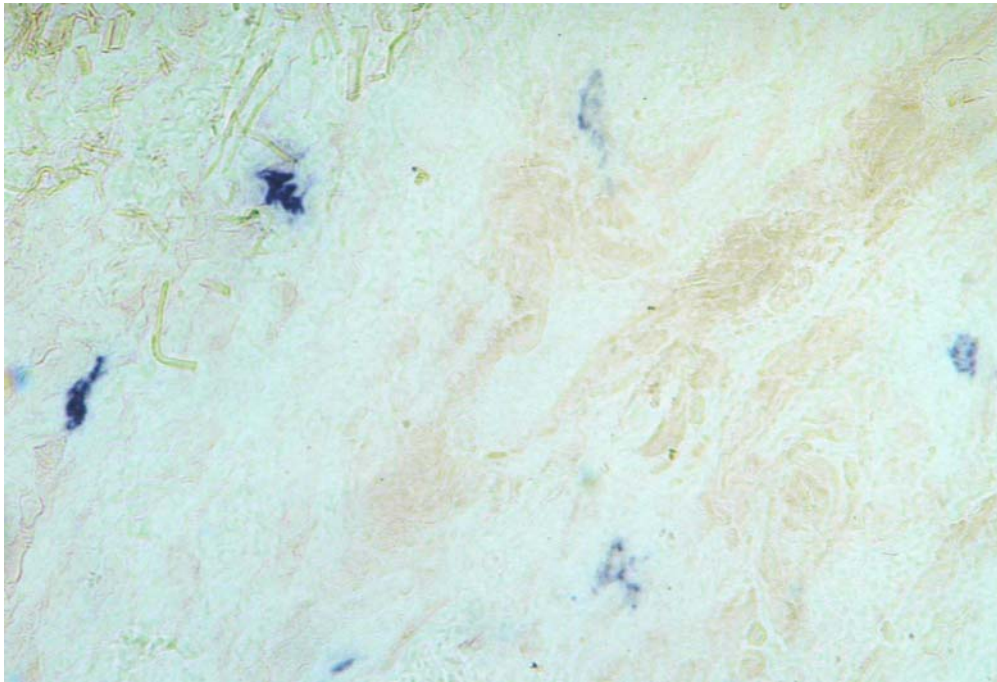
Unter mehreren Möglichkeiten der Anfärbung von Mastzellen haben wir die enzymhistochemische sequentielle Doppelfärbung der Proteasen Chymase und Tryptase gewählt, mit deren Hilfe eine Subtypisierung in MCT und MCTC möglich ist. In gesunder humaner Haut finden

sich weitaus überwiegend MCTC, nämlich 88 % (Galli, 1990; Irani *et al.*, 1986; Irani & Schwartz, 1989). In Narben kehrt sich dieses Verhältnis um mit nur noch 9 % MCTC bei insgesamt etwa gleicher Menge von MCT. Dieses Ergebnis korrespondiert zu Publikationen, in denen eine relative Vermehrung von MCT auch bei anderen entzündlichen Prozessen der Haut beschrieben wurde (Algermissen *et al.*, 1994; Harvima *et al.*, 1990; Jarvikallio *et al.*, 1997).

Hinsichtlich fibrosierender Prozesse und Mastzellsubtypen liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Bei der Sklerodermie wurde eine weitgehende Abnahme der MCTC beobachtet (Irani *et al.*, 1992). Bei der rheumatoiden Arthritis ebenso wie bei der fibrosierenden Glomerulonephritis fanden sich bei insgesamt erhöhter Mastzellzahl in Bereichen aktiver fibrosierender Entzündung vermehrt MCTC (Gotis-Graham & McNeil, 1997; Toth *et al.*, 1999). Ca 80 bis 95 % der in arteriosklerotischen Karotiden insgesamt vermehrten Mastzellen waren MCTC (Jeziorska *et al.*, 1997). Wie zu erwarten, zeigte sich im Rahmen einer Mastzellvermehrung im späten fibrosierenden Stadium des respiratorischen Distress-Syndroms der Lunge keinerlei Änderung des MCT/MCTC-Verhältnisses bei Dominanz von MCT in Lungengewebe (s.o. 1.4.1.3) (Liebler *et al.*, 1998). Beim Gewebeumbau im Rahmen von Wundheilung und Fibrosierung werden proentzündliche Zytokine von ortsständigen und einwandernden Zellen freigesetzt, die zu Veränderungen des Mikromilieus führen. Diese Prozesse können in den verschiedenen Organen wie Haut, Lunge, Arterien, Synovia oder Niere unterschiedlich ausgeprägt sein. In Abhängigkeit von Situation und Umgebung sind Konversion von Mastzellsubtypen sowie Änderungen der von Mastzellen exprimierten Zytokine gut möglich (Bradding *et al.*, 1995b; Irani & Schwartz, 1989; Lorentz *et al.*, 2000).

Das auffällige Verschwinden chymasehaltiger Mastzellen in Narbengewebe scheint dem in der Literatur beschriebenen „Verschwinden“ von mit Avidin und Toluidin anfärbbaren Mastzellen bei der Sklerodermie, der GVHD der Maus sowie bei der Wundheilung zu entsprechen. Da mit anderen Darstellungsmethoden, die nicht auf Anfärbung der Granula beruhen, nämlich elektronenmikroskopisch oder durch Markierung von membranständigen IgE-Rezeptoren, scheinbar verschwundene Mastzellen doch sichtbar gemacht werden konnten, wurden sie als Phantommastzellen bezeichnet (Choi & Claman, 1987; Choi *et al.*, 1987; Claman, 1990; Claman *et al.*, 1986; Wichmann, 1955). Dieses Phänomen wird durch De- und Transgranulation von Mastzellen in akut und chronisch traumatisierter Haut erklärt (Claman, 1989; Irani *et al.*, 1992; Pearson *et al.*, 1988; Seibold *et al.*, 1990). Auch die bei unseren Ar-

beiten aufgefallene kleinere Zellgröße und geringere Anfärbbarkeit sowohl von chymase- als auch von tryptasehaltigen Mastzellen in Narben paßt zum Konzept der Degranulation (Abb. 5).



**Abb. 5:** Schwach angefärbte, blasse MCT in Narbengewebe (rechts im Bild) neben normalen MCT in der angrenzenden normalen Haut (links im Bild); enzymhistochemische Färbung, x 400.

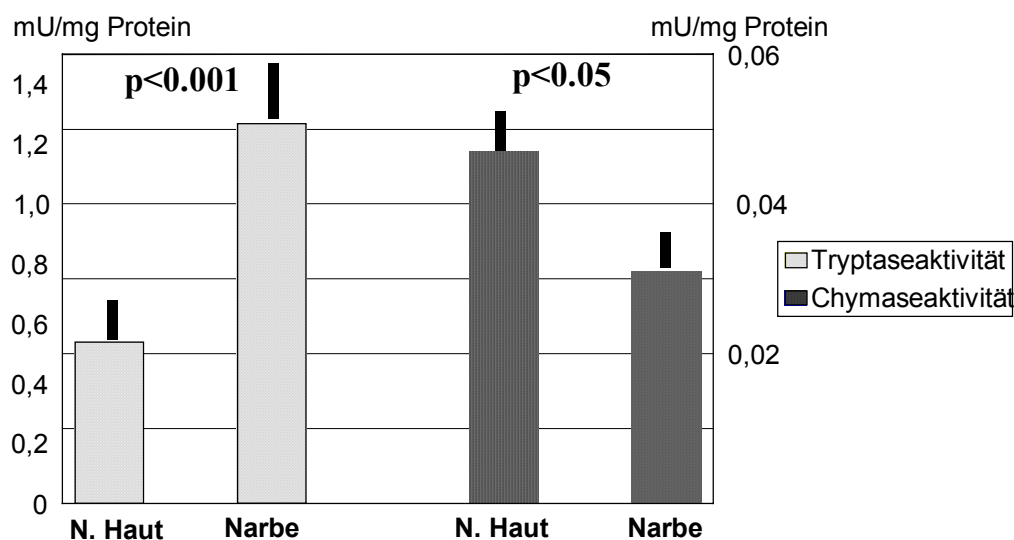
Bemerkenswert ist jedoch die in frischen und älteren Narben gleichermaßen geringe Anzahl von MCTC. Zum einen kann eine kontinuierliche Aktivierung von Mastzellen mit ständiger langsamer Degranulation eine Rolle spielen. Hiermit wären die Funktionen der Proteasen im Bindegewebsmetabolismus gut zu vereinbaren (Akers *et al.*, 2000; Atkins & Clark, 1987; Fang *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1996; Gruber & Schwartz, 1990; Hartmann *et al.*, 1992; Kofford *et al.*, 1997; Lees *et al.*, 1994; Trautmann *et al.*, 1998). Möglicherweise ist auch das Mikromilieu von Narbengewebe der Entwicklung von MCTC abträglich, die sich nicht in allen Organen und nur unter speziellen Kulturbedingungen entwickeln (Li *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1987). Außerdem wurde beobachtet, daß die nach vorübergehendem Verschwinden wieder in Erscheinung tretenden und durch Granulafärbung identifizierbaren Mastzellen Charakteristika unreifer Mastzellen aufweisen (Choi *et al.*, 1987). Unreife Mastzellen enthalten Tryptase, jedoch keine Chymase (Czarnetzki *et al.*, 1995). Als Erklärung liegt nahe, daß nach

Degranulation, gegebenenfalls auch Destruktion der ortsständigen Mastzellen, unreife Mastzellen oder Mastzellvorläufer durch Mediatoren angelockt werden und in das Granulations- bzw. Narbengewebe einwandern und hier persistieren. Solche chemotaktischen Mediatoren, z.B. SCF, TGF- $\beta$ , Komplementfaktoren oder IL-8, können einerseits aus den degranulierten Mastzellen selbst stammen, zum anderen aus aktivierten Endothelzellen, Fibroblasten oder eingewanderten Entzündungszellen (Hartmann *et al.*, 1997; Lippert *et al.*, 1998).

Für die Präsenz unreifer Mastzellen in Narben spricht unsere Beobachtung, daß sich bei Mastzellmarkierung mit einem Antikörper gegen den membranständigen SCF-R c-Kit in der Dermis von Narben mehr Zellen anfärben ließen als in gesunder Haut. Der Unterschied der jeweils markierten Zellen erreichte Signifikanz für die mittlere und tiefe Dermis. c-Kit ist als membranständiger Rezeptor auch auf degranulierten Mastzellen vorhanden und wird sowohl von unreifen als auch von reifen Mastzellen exprimiert, so daß davon ausgegangen werden kann, daß mit der Markierung SCF-R-positiver Zellen in der Dermis die meisten Mastzellen dargestellt werden im Vergleich zu den anderen in unseren Untersuchungen verwendeten Mastzellfärbemethoden (Valent, 1995). Dermale, möglicherweise c-Kit-exprimierende Melanozyten wurden durch die negativ verlaufene Färbung mit dem Melanosomenmarker TA99 ausgeschlossen. Die bei Verwendung von Mastzellgranulafärbungen beschriebene Dynamik der Mastzellzahlen bei fibrosierenden Prozessen mit anfänglichem Rückgang und späterem Überschießen läßt sich bei Markierung des C -Kit auf Mastzellen nur für die zweite Phase mit Zunahme der Mastzellen nachvollziehen.

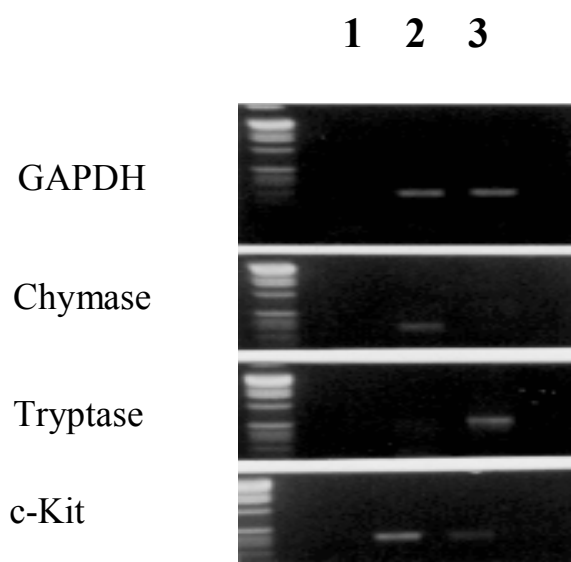
#### 4.2. MC-Proteasen in Narbengewebe

Die Messung der Proteaseaktivitäten in homogenisierten Gewebsextrakten von Narben versus gesunde Haut zeigte einen signifikanten Anstieg der Tryptaseaktivität ( $p < 0,001$ ) und im Gegensatz dazu eine signifikante Verminderung der Chymaseaktivität ( $p < 0,05$ ) in Narben im Vergleich zu normaler Haut (Abb. 6, S. 53).



**Abb. 6:** Proteaseaktivitäten in Gewebsextrakten aus normaler Haut und Narben jeweils derselben Patienten (mU/mg Protein). MW + SD; N = 7.

In Übereinstimmung damit ließen sich mittels semiquantitativer RT-PCR ebenfalls in homogenisierten Gewebsextrakten eine erhöhte Expression von Tryptase-mRNA sowie eine herabgesetzte Expression von Chymase-mRNA in Narben nachweisen (Tab. 6, S. 54; Abb. 7).



**Abb. 7:** Durch semiquantitative RT-PCR ermittelte mRNA-Expression von Chymase, Tryptase und c-Kit in Gewebsextrakten aus Narben und normaler Haut. Repräsentatives Beispiel von N = 5 Experimenten. 1 = Kontrolle ohne cDNA; 2 = normale Haut; 3 = Narbe.

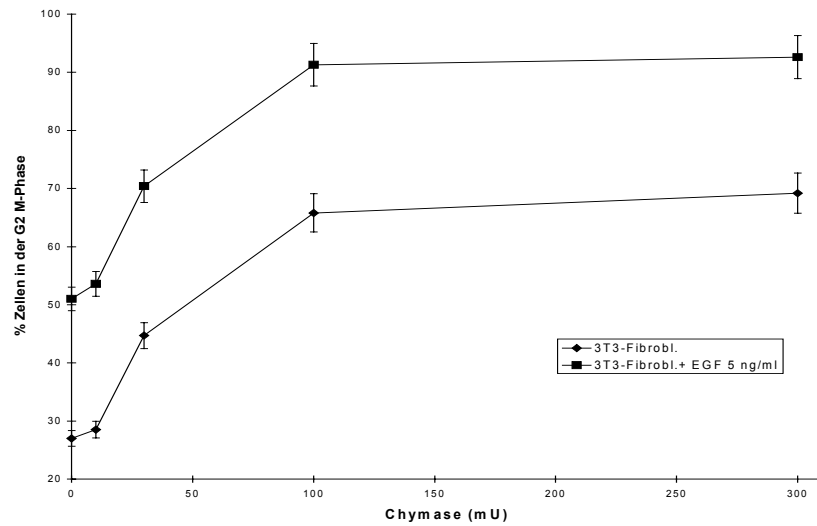
**Tabelle 6:** : Densitometrische Analyse der Signalintensität von Banden einer RT-PCR mit DNA-Primern für Chymase, Tryptase und c-Kit. MW  $\pm$  SD von N = 5, \* p < 0,05 im Vergleich zu normaler Haut.

DNA-Primer für	Narben	Normale Haut
Chymase	0,2 $\pm$ 0,1*	0,4 $\pm$ 0,1
Tryptase	2,9 $\pm$ 1,0*	0,8 $\pm$ 0,4
c-Kit	1,0 $\pm$ 0,4*	1,7 $\pm$ 0,6

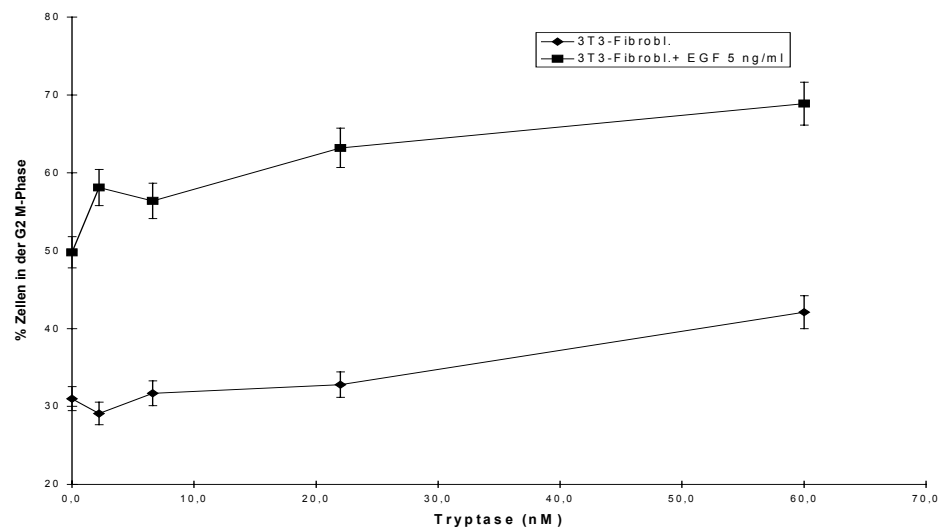
Die Verminderung der Chymaseaktivität und der Chymase-mRNA-Expression in Narbengewebeextrakten steht in Einklang mit der immunhistochemisch nachgewiesenen starken Abnahme von MCTC in Narben (s. 4.1.1). Die Narben, die zur Herstellung der Gewebsextrakte dienten, waren zwischen 23 und 56 Tage alt. Die nach Gewebetraumatisierung einsetzende Degranulierung der Mastzellen mit Freisetzung von Chymase und Tryptase scheint in diesem Zeitintervall keine entscheidende Rolle mehr zu spielen. Der Anstieg der Tryptaseaktivität und der Tryptase-mRNA-Expression in Narbengewebeextrakten desselben Narbenalters paßt sowohl zu der in Narben immunhistochemisch nachgewiesenen kontinuierlichen Präsenz von MCT, die in älteren Narben (> 35 Tage) an Zahl noch zunehmen, als auch zu der veränderten Morphe der MCT mit auffällig kleinerer Zellgröße und geringerer Anfärbbarkeit als in normaler Haut, die fortgesetzte Degranulation nahelegt (s. 4.1.1). Auch die in Narbengewebe vermehrten c-Kit-positiven, möglicherweise unreifen Mastzellen können durch andauernde Degranulation zur Erhöhung der Tryptaseaktivität beitragen (s. 4.1.2 und 4.1.3).

#### 4.2.1. Mitogene Wirkung der Mastzellproteasen auf Fibroblasten und Keratinozyten

Um die potentielle Bedeutung der Proteasen aus Mastzellen für die Wundheilung zu klären, wurden Untersuchungen zu ihrer mitogenen Wirkung auf Fibroblasten durchgeführt. Zunächst wurde der Effekt des Kulturzusatzes FCS ermittelt. Subkonfluente 3T3-Fibroblastenkulturen zeigten bei einem FCS-Gehalt von 0,05 - 10 % eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Proliferation, die bei 5 - 10 % FCS am ausgeprägtesten war. Zusatz von Chymase und Tryptase zu in 5 % FCS inkubierten 3T3-Fibroblasten bewirkte jeweils eine dosisabhängige Zunahme der Mitogenität, die für Chymase ausgeprägter als für Tryptase war. Zugabe von EGF führte zu einer weiteren Zunahme der Mitogenität der 3T3-Fibroblasten mit parallelem Kurvenverlauf (Abb. 8).



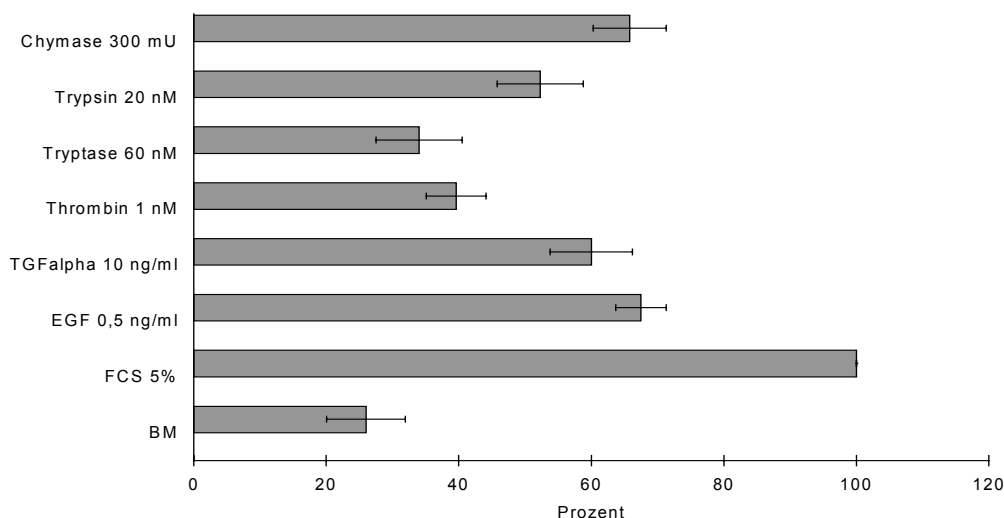
(a)



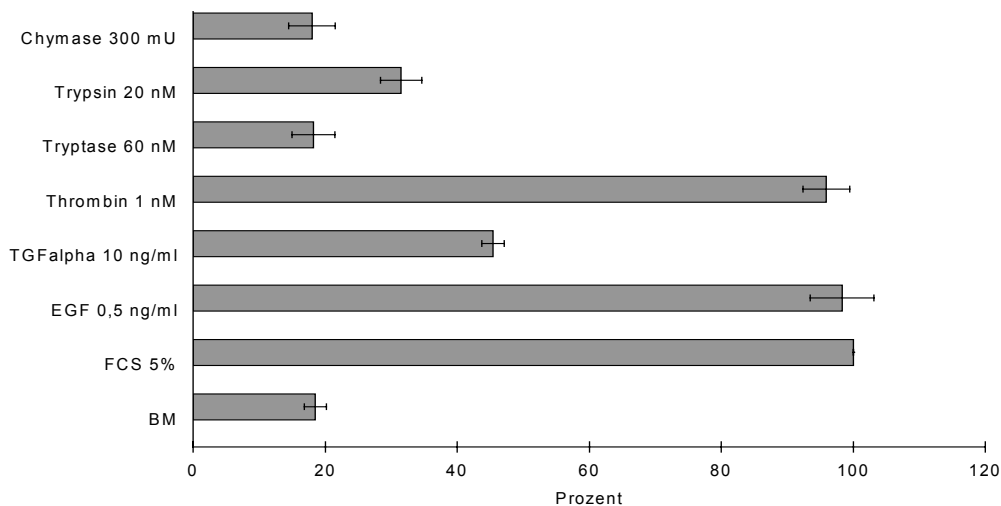
(b)

**Abb. 8:** Dosisabhängiger Effekt von Chymase (a) und Trypsin (b) auf die Mitogenität von in 5 % FCS inkubierten 3T3-Fibroblasten allein oder nach Zugabe von EGF (5 ng/ml). MW  $\pm$  SD; N = 3.

Im Vergleich mit anderen mitogenen Stimuli entsprach der proliferationsfördernde Effekt von Chymase dem von TGF  $\alpha$  und EGF; geringere Effekte wurden mit Trypsin,  $\alpha$ -Thrombin und Tryptase in absteigender Reihenfolge erzielt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Maximale mitogene Antwort von subkonfluenten 3T3-Fibroblasten auf verschiedene Wachstumsfaktoren und Serinproteasen. Der durch 5% FCS erzielte mitogene Effekt wurde als 100 % definiert. MW  $\pm$  SD; N = 3.



**Abb. 10:** Maximale mitogene Antwort von subkonfluenten HaCaT-Keratinocyten auf verschiedene Wachstumsfaktoren und Serinproteasen. Der durch 5% FCS erzielte mitogene Effekt wurde als 100 % definiert. MW  $\pm$  SD; N = 3.



Da Keratinozyten für den Wundverschluß wesentlich sind, wurden entsprechende Untersuchungen an HaCaT-Keratinozyten durchgeführt. Dabei war FCS konzentrationsabhängig der stärkste proliferationsfördernde Faktor. Chymase und Tryptase zeigten in unterschiedlichen Konzentrationen keinerlei mitogenen Effekt auf HaCaT-Keratinozyten und inhibierten sogar die durch EGF und  $\alpha$ -Thrombin stimulierte Proliferation (Abb. 10, S. 56; Tab. 7).

**Tabelle 7:** Durch Chymase und Tryptase erzielte maximale Hemmung der mitogenen Antwort von HaCaT-Keratinozyten auf Stimulation mit EGF und  $\alpha$ -Thrombin. Die Werte für EGF und  $\alpha$ -Thrombin wurden jeweils auf 100 gesetzt. Optimale Konzentrationen der Mastzellproteasen stehen in Klammern. Mittelwert von N = 3.

Mastzellprotease	% Inhibition durch	
	EGF (0,5 ng/ml)	$\alpha$ -Thrombin, 1 nM
Chymase	32,8 (300 mU)	45,8 (100 mU)
Tryptase	30,5 (2,2 nM)	55,8 (2,2 nM)

Diese Ergebnisse bestätigen die proliferationsfördernde Wirkung von Tryptase auf Fibroblasten und zeigen denselben Effekt in noch ausgeprägterer Form auch für Chymase (Akers *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 1992; Levi-Schaffer & Kupietzky, 1990; Levi-Schaffer & Rubinchik, 1995; Ohtsuka, 2000; Ruoss *et al.*, 1991; Trautmann *et al.*, 1998). Die im initialen Stadium nach Gewebetraumatisierung freigesetzte Chymase kann so zur Reparatur des Bindegewebes beitragen, wohingegen eine Epithelisierung zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht sinnvoll erscheint, was mit dem fehlenden mitogenen Effekt der Chymase auf Keratinozyten vereinbar ist. Der Anstieg der Tryptaseaktivität und der Tryptase-mRNA-Expression in Extrakten von 23 bis 56 Tage altem Narbengewebe spricht dafür, daß Tryptase anhaltend eine fibroproliferative Wirkung ausübt.

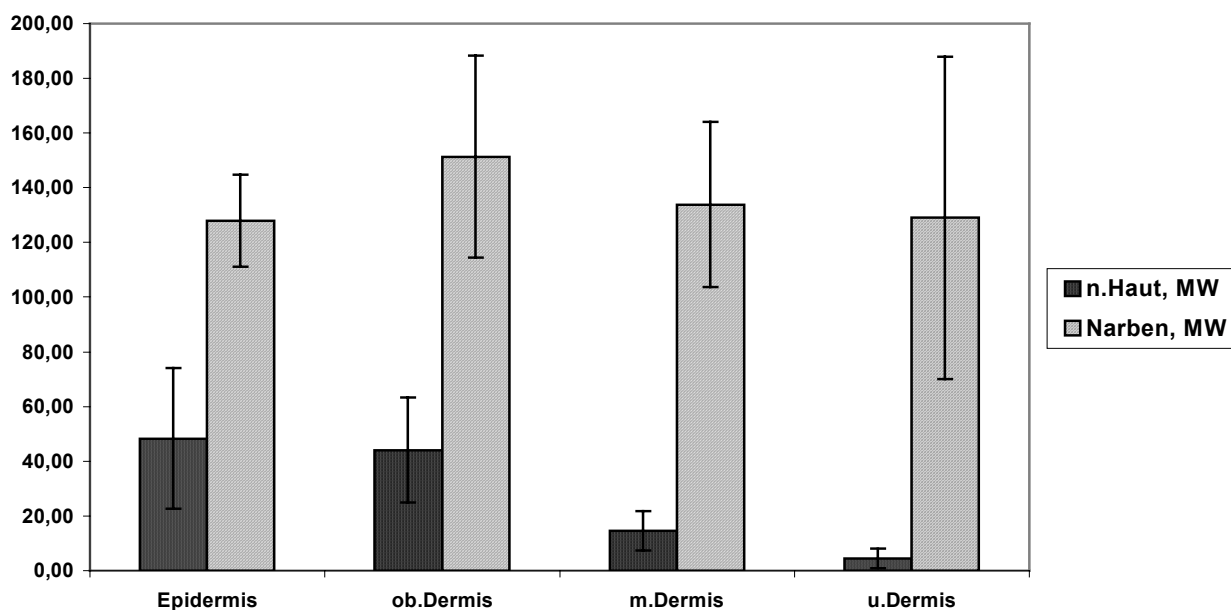
In anderen bisher publizierten Studien zeigte Chymase aus Hundemastzellen keinerlei Effekt auf Lungenfibroblasten von Hamstern oder Rattenfibroblasten, im Gegensatz zu Tryptase (Ruoss *et al.*, 1991). Rattenmastzellprotease I, die der Chymase entspricht, ist in der Lage, den Zellstoffwechsel zu beeinflussen und inhibiert *in vitro* das Wachstum von Fibrosarkomzellen (Chan & Sharp, 1994). Welche pathogenetischen Mechanismen für stimulierende oder inhibierende Effekte der Mastzellproteasen auf die Proliferation unterschiedlicher Zellen verantwortlich zu machen sind, ist bisher ungeklärt. Die Aktivierung eines speziellen Signal-

transduktionsweges in Hamsterfibroblasten durch Tryptase wird vermutet (Ruoss *et al.*, 1991). Der o. g. Effekt der Rattenmastzellprotease I auf Fibrosarkomzellen ist rezeptormediert (Chan & Tharp, 1994). Insgesamt scheinen die Proteasen somit fähig zu sein, selektiv auf spezifische Zelltypen Einfluß nehmen zu können. Diese Eigenschaft kann gerade für die Wundheilung und den Gewebeumbau bei der Narbenbildung wichtig sein und differenzierte Interaktion mit anderen Wachstumsfaktoren ermöglichen.

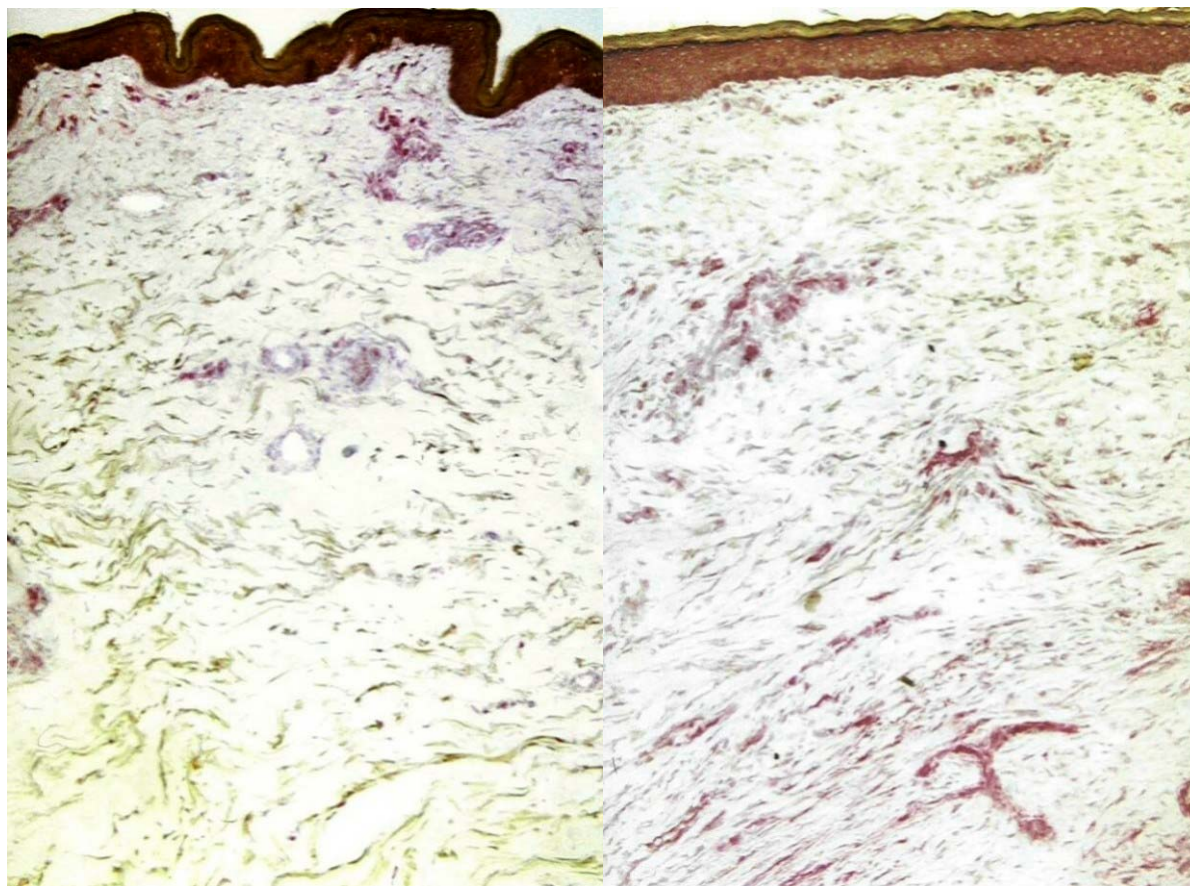
#### 4.3. Mastzellwachstums- sowie chemotaktische Faktoren und Rezeptoren in humanem Narbengewebe

##### 4.3.1. SCF und SCF-Rezeptor

Dem SCF sowie seinem Rezeptor galt wegen seiner wichtigen Rolle als humaner Mastzellwachstumsfaktor zunächst das Interesse. In der Immunhistochemie normaler Haut exprimierten diejenigen Zellen SCF, deren Fähigkeit zur Produktion von SCF bekannt ist, und zwar Keratinozyten und Endothelzellen, weniger ausgeprägt Fibroblasten und nicht näher definierte perivaskuläre Zellen, darunter Mastzellen (Grabbe *et al.*, 1994b; Welker *et al.*, 1999). Dasselbe Muster ergab sich auch in Narbengewebe, allerdings bei insgesamt kräftigerer Färbeintensität. Überdies ließen sich in der Dermis deutlich mehr SCF-positive Zellen nachweisen (Abb. 11; Abb. 12, S. 60). Dementsprechend war auch die SCF-mRNA in Narbengewebe im Vergleich zu normaler Haut signifikant erhöht und sprach somit für eine gesteigerte Produktion des Moleküls und nicht für einen erniedrigten Abbau (Tab. 9, S. 66; Abb. 15, S. 66).



**Abb. 11:** Immunhistochemische Expression von SCF in normaler Haut (n.Haut) versus Narbengewebe. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF in der Epidermis sowie in der oberen (ob.), mittleren (m.) und unteren (u.) Dermis  $\pm$  SD dar. Die Werte unterscheiden sich jeweils signifikant voneinander (Epidermis:  $p = 0,0007$ , obere Dermis:  $p = 0,001$ , mittlere Dermis:  $p = 0,0007$ , untere Dermis:  $p = 0,002$ ).



(A)

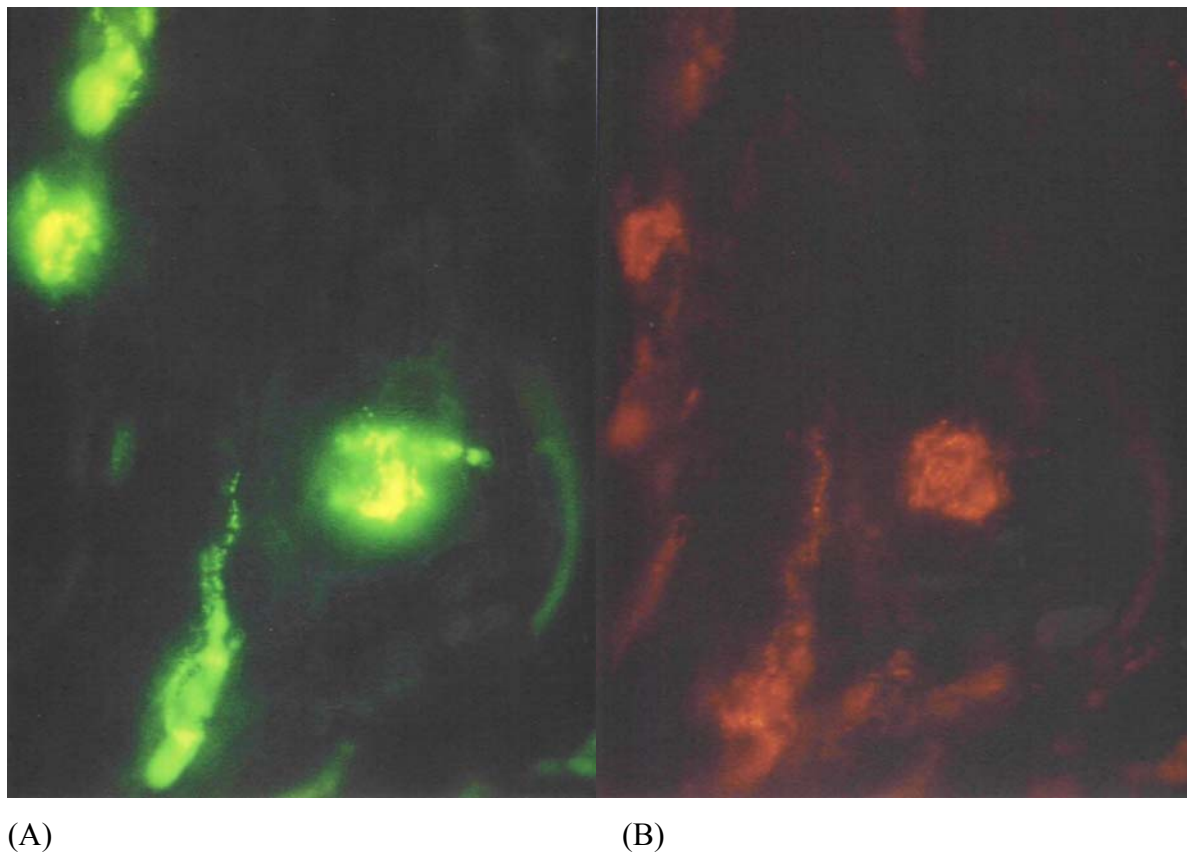
(B)

**Abb. 12:** SCF-Reaktivität in normaler Haut (A) und in Narbengewebe (B). APAAP-Färbung mit anti-SCF, jeweils x 100.

Im Vergleich zur normalen Haut fand sich in der Dermis von Narbengewebe auch eine größere Zahl SCF-R-positiver Zellen in allen Koriumetagen (siehe Tab. 3, S. 44). Wie in 4.1.2 erörtert, stellen diese Zellen ausschließlich Mastzellen dar, so daß davon ausgegangen werden kann, daß Effekte von SCF bei der Wundheilung über Mastzellen vermittelt werden. In Narbengewebe stellen verschiedene, durch proinflammatorische Stimuli aktivierte Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, auch Mastzellen potentielle Quellen für die SCF-Sekretion dar. Überdies spielt die Differenzierung einzelner Zelltypen bei der SCF-Produktion eine Rolle (Grabbe *et al.*, 1996; Welker *et al.*, 1999). Die Zunahme von SCF in Narbengewebe dürfte wiederum zur vermehrten Rekrutierung von c-Kit- und tryptasepositiven Mastzellvorläufern in Narbengewebe beitragen. PDGF, das nach Traumatisierung von Thrombozyten, Neutrophilen und Mastzellen freigesetzt wird, führt in vitro via Erhöhung von membrangebundenem SCF auf Fibroblasten indirekt ebenfalls zur Mastzellproliferation (Artuc *et al.*, 1999; Hiragun *et al.*, 1998). Die Zell-Zell-Interaktion von Fibroblasten und Mastzellen via SCF / c-Kit führt bei der Maus zur vermehrten Stimulation von Mastzellen mit Histamin- und Zytokinfreiset-

zung (Hogaboam *et al.*, 1998). Bei der Narbenbildung könnte die Interaktion SCF / c-Kit bei Zell-Zell-Kontakt von Fibroblasten und Mastzellen Bedeutung für die Kontraktion von Kollagenfasern im Verlauf der Gewebewiederherstellung haben (Yamamoto *et al.*, 2000). Unsere Befunde korrespondieren zu der in der frühen Phase der systemischen Sklerodermie immunhistochemisch festgestellten vermehrten dermalen SCF-Expression (Kihira *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1998).

Ergänzend untersuchten wir mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung, wieviele avidingefärbte Mastzellen jeweils in normaler Haut und in Narbengewebe SCF-R-positiv sind (Abb. 13). In normaler Haut exprimierten 87 % der durch die Avidinfärbung markierten Mastzellen c-Kit, 13 % waren SCF-R-negativ.



**Abb. 13:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung desselben Ausschnitts mit Avidin (A) und dem c-Kit-Antikörper YB5.B8 (B), normale Haut, x 1000.

Dagegen fanden sich in neun Gewebeschnitten von Narben unabhängig vom Narbenalter keine avidinpositiven Mastzellen, in den übrigen Schnitten nur schwach fluoreszierende, einzelne avidingefärbte Mastzellen, die in 56 % c-Kit-positiv, in 44 % c-Kit-negativ waren, wiederum unabhängig vom Narbenalter. Da mittels Avidinfärbung vermutlich nur MCTC, nicht aber MCT erfaßt werden, paßt die Darstellung nur einzelner Mastzellen mit dieser Methode in Narbengewebe zu den mit der Chymasefärbung erhaltenen Ergebnissen, da unreife Mastzellen, die vermutlich vermehrt in Narben rekrutiert werden, keine Chymase enthalten (s. auch 4.1.1 und 4.1.3) (Irani *et al.*, 1992). Allerdings exprimieren unreife Mastzellen bereits den c-Kit, so daß bei den mit der Avidinfärbung identifizierten reifen Mastzellen eigentlich die Expression des c-Kit zu erwarten gewesen wäre. c-Kit-negative Mastzellen wurden auch von Mayrhofer *et al.* beschrieben (Mayrhofer *et al.*, 1987). Im folgenden aufgeführte Ursachen könnten für die Herabregulierung der c-Kit-Expression maßgebend sein. Nach Bindung von SCF, der - wie wir zeigen konnten (s.o.) - im Rahmen der Narbenbildung vermehrt vorhanden ist, an seinen Rezeptor c-Kit kann eine Rezeptor-Ligand-Internalisierung und damit Abnahme der Anzahl der SCF-Rezeptoren eintreten. Auch durch De- und Transgranulationsprozesse ist ein Rezeptorverlust denkbar. Anschließend ist eine Neusynthese des c-Kit erforderlich (Shimizu *et al.*, 1996). An humanen Lungenmastzellen und an HMC-1-Zellen wurde dosis- und zeitabhängig eine Herabregulation des c-Kit durch SCF nachgewiesen (Baghestanian *et al.*, 1996). Außerdem ist eine Herunterregulierung des c-Kit auf Mastzellen durch IL-4 bekannt (Nilsson *et al.*, 1994b; Sillaber *et al.*, 1991). Bei der Wundheilung ist eine Freisetzung von IL-4 sowohl durch Mastzellen selbst, als auch durch Lymphozyten möglich. Ein T-lymphozytäres Infiltrat wird noch über ein Jahr nach Traumatisierung in Narbengewebe beschrieben (Borgognoni *et al.*, 1995).

Gegenüber normaler Haut war die c-Kit-mRNA in Narbengewebe trotz der erhöhten Zahl c-Kit-positiver dermaler Zellen in Narben vermindert (siehe 4.1.2 und Abb. 7, S. 53; Tab. 6, S. 54). Die oben diskutierte Herabregulation von c-Kit auf avidinpositiven Mastzellen dürfte bei der c-Kit-mRNA-Abnahme in Narben wegen der insgesamt sehr geringen Zahl dieser Zellen nur eine unbedeutende Rolle spielen. Leichter läßt sich dieses Ergebnis durch die stark erniedrigte Expression des c-Kit auf epidermalen Melanozyten in Narbengewebe (s.4.1.2) erklären, da jedenfalls in normaler Haut Melanozyten deutlich zahlreicher als Mastzellen vorhanden sind und damit unter normalen Umständen wesentlich zur Gesamtmenge des c-Kit beitragen.

#### 4.3.2. NGF und NGF-Rezeptoren

Im Gegensatz zu SCF wird NGF immunhistochemisch nur von wenigen epidermalen und dermalen Zellen und schwach exprimiert ohne erkennbaren Unterschied zwischen normaler Haut und Narbengewebe (nicht gezeigt). Auch die NGF-mRNA war in beiden Geweben in gleicher Menge vorhanden (nicht gezeigt).

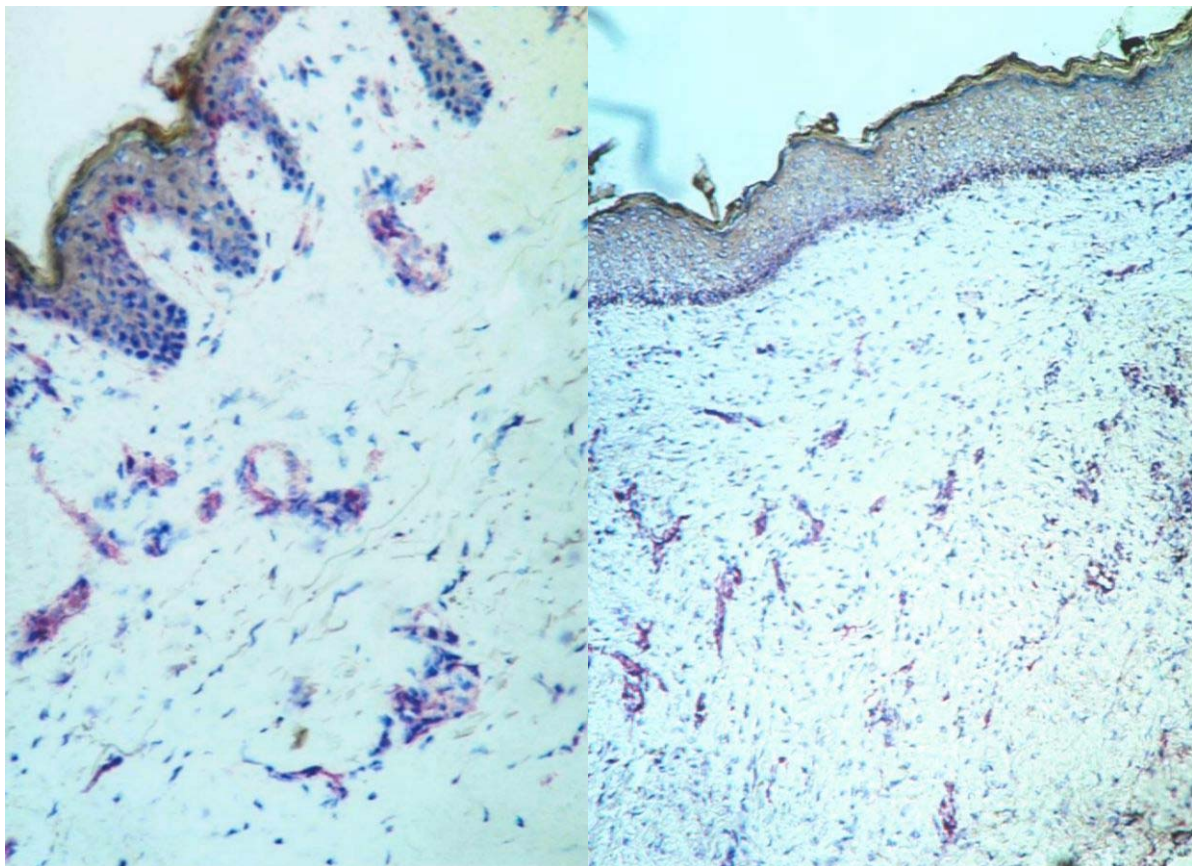
Dagegen wiesen die Daten für die NGF-R deutliche Unterschiede auf. In der Immunhistochemie zeigte sich das Epithel von Schweißdrüsen besonders stark mit dem Antikörper gegen den NGF-R TrkA angefärbt. Die Reaktivität beschränkte sich in der Epidermis auf die mittleren Epidermislagen. Der NGF-R TrkA war in der Dermis von Narbengewebe signifikant vermehrt exprimiert im Vergleich zu normaler Haut (Tab. 8, S. 64).

Im Gegensatz zu diesen Befunden mit dem NGF-R TrkA fand sich eine Expression des NGF-R p75 immunhistochemisch in normaler Haut in der basalen Epidermis jeweils suprapapillär und in der Dermis im Bereich der äußeren Haarwurzelscheiden sowie von Nerven- und Muskelzellen und von Gefäßen, Schweiß- und Talgdrüsen (Abb. 14, S. 65). Im oberen Korium waren mehr p75-positive Zellen vorhanden als in der tiefen Dermis. In Narben zeigten sich in der Epidermis nur vereinzelte basale Zellen angefärbt mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zur normalen Haut. In der Dermis fiel eine markante Anfärbung der Gefäße und des entzündlichen Zellinfiltrates auf, wobei im mittleren und tiefen Korium mehr reaktive Zellen waren als im oberen Korium, und im tiefen Korium signifikant mehr reaktive Zellen als in gesunder Haut ( $p < 0,0007$ ) (Tab. 8, S. 64; Abb. 14, S. 65). Die mRNA beider NGF-Rezeptoren war in Narben signifikant vermehrt, besonders ausgeprägt für den TrkA (Tab. 9, S. 66; Abb. 15, S. 66).

**Tabelle 8:** Immunhistochemische epidermale und dermale Expression der NGF-, GM-CSF- und TGF- $\beta$ -Rezeptoren in normaler Haut und Narbengewebe. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro 6,25 mm Länge (Epidermis) bzw. pro 0,0625 mm<sup>2</sup> (Dermis)  $\pm$  SD dar. (- = nicht signifikant bei  $p > 0,05$ )

	Normale Haut	Narben	stat. sign. (p =)
<b>NGFR-TrkA</b>			
Epidermis	62.17 $\pm$ 72.13	102.96 $\pm$ 82.27	-
Obere Dermis	5.50 $\pm$ 6.02	22.04 $\pm$ 17.79	0,000066
Mittlere und tiefe Dermis	0.81 $\pm$ 2.30	18.69 $\pm$ 18.99	0,000024
<b>NGFR-p75</b>			
Epidermis	11.76 $\pm$ 2.36	0.34 $\pm$ 0.17	0,0001
Obere Dermis	8.84 $\pm$ 2.08	8.05 $\pm$ 2.09	-
Mittlere und tiefe Dermis	3.67 $\pm$ 2.37	10.27 $\pm$ 1.90	0,0007
<b>GM-CSFR</b>			
Epidermis	1.33 $\pm$ 0.44	1,67 $\pm$ 0.72	-
Obere Dermis	2.08 $\pm$ 0.68	5.21 $\pm$ 1.62	-
Mittlere und tiefe Dermis	0.37 $\pm$ 0.28	3.52 $\pm$ 1.77	0,0013
<b>TGF-<math>\beta</math>-R I</b>			
Epidermis	29.74 $\pm$ 33.97	114.21 $\pm$ 54.19	0,000003
Obere Dermis	7.94 $\pm$ 7.09	62.35 $\pm$ 35.45	0,000009
Mittlere und tiefe Dermis	1.20 $\pm$ 2.69	65.71 $\pm$ 35.89	0,000014
<b>TGF-<math>\beta</math>-R II</b>			
Epidermis	90.63 $\pm$ 33.76	156.47 $\pm$ 61.74	0,00078
Obere Dermis	79.65 $\pm$ 53.26	119.72 $\pm$ 68.29	-
Mittlere und tiefe Dermis	18.5 $\pm$ 15.58	89.41 $\pm$ 11.29	0,000051





(A)

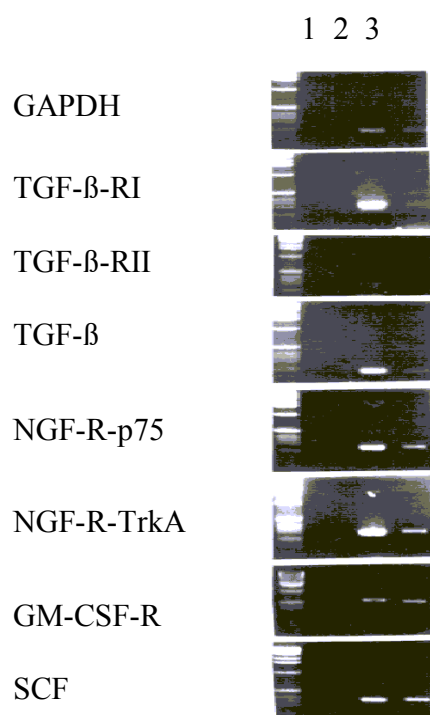
(B)

**Abb. 14:** : Immunhistochemische Expression des NGF-R-p75 in normaler Haut [(A), x 200] und in Narbengewebe [(B), x 100]. APAAP-Färbung mit anti-NGF-R-p75.

**Tabelle 9:** Densitometrische Analyse der RT-PCR-Signalintensität mit DNA-Primern für verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren. MW  $\pm$  SD von N = 5 (# N = 6), \* p < 0,01,

DNA-Primer für	Narben	Normale Haut
GAPDH	100 $\pm$ 30	80 $\pm$ 25
SCF #	265 $\pm$ 90 **	130 $\pm$ 70
NGF-R-TrkA	950 $\pm$ 250 *	220 $\pm$ 80
NGF-R-p75	350 $\pm$ 90 *	110 $\pm$ 50
GM-CSF-R	120 $\pm$ 40	110 $\pm$ 60
TGF- $\beta$	480 $\pm$ 200 *	30 $\pm$ 10
TGF- $\beta$ -R Typ I	750 $\pm$ 180 *	60 $\pm$ 30
TGF- $\beta$ -R Typ II	220 $\pm$ 100 *	40 $\pm$ 20

\*\* p < 0,02 im Vergleich zu normaler Haut.



**Abb. 15:** Durch semiquantitative RT-PCR ermittelte mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren im Vergleich zu GAPDH in Gewebsextrakten aus Narben und normaler Haut. Repräsentatives Beispiel von N = 5 Narben mit einem Narbenalter von 23 - 56 Tagen. 1 = Kontrolle ohne cDNA; 2 = Narbe; 3 = normale Haut.

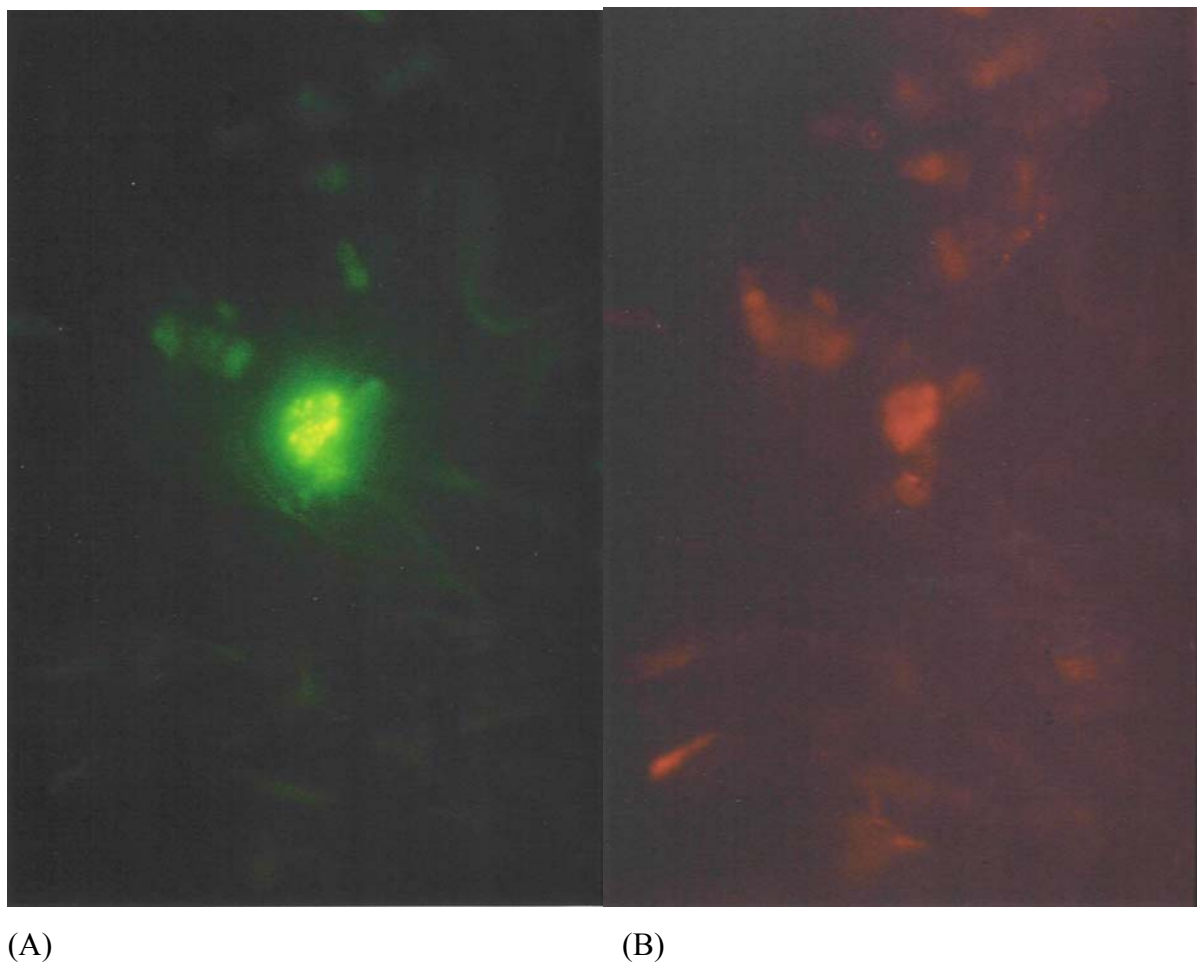
Da NGF als wundheilungsfördernder Faktor bekannt ist, ist die geringe Expression ohne Unterschied zwischen normalem und Narbengewebe überraschend (Hutson *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1980; Matsuda *et al.*, 1998). Technische Gründe könnten bei der fehlenden Identifikation von NGF eine Rolle spielen oder aber NGF könnte sehr schnell abgebaut werden. Überdies ist die Fähigkeit verschiedener Zellen, NGF zu produzieren, äußerst variabel und hängt von zusätzlichen Stimuli ab wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ , PDGF und IL-1 bei Keratinozyten (Cartwright *et al.*, 1994; Di Marco *et al.*, 1991). Jedoch sind Effekte auch kleinerer Mengen von NGF über seine Rezeptoren, die in Narben beide auf mRNA- und Proteinebene vermehrt sind, bei der Wundheilung möglich.

Für Keratinozyten, Monozyten und Mastzellen wurde die TrkA-Expression beschrieben, so daß seine Hochregulierung in Narbengewebe mit Vermehrung beziehungsweise Aktivierung dieser Zellen gut in Einklang zu bringen ist (Ehrhard *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1997; Pincelli *et al.*, 1994; Tam *et al.*, 1997; Welker *et al.*, 2000a; Welker *et al.*, 1998). Die epidermalen p75-positiven Zellen dürften in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten Keratinozyten und Melanozyten darstellen (Di Marco *et al.*, 1993; Yaar *et al.*, 1994). Nach Abschluß der Epithelisierungsphase im Rahmen der Wundheilung sinkt die von anderen Autoren als anfänglich erhöht beschriebene p75-Expression der Keratinozyten, wie sich in unserer Arbeit bestätigen ließ (Di Marco *et al.*, 1991; Di Marco *et al.*, 1993). Die Verminderung der p75-positiven Zellen in der Epidermis mag zusätzlich wie bei c-Kit durch eine Reduktion dieses Rezeptors auf Melanozyten in der Epidermis von Narbengewebe bedingt sein (siehe auch 4.1.2).

Sowohl die erniedrigte epidermale als auch die erhöhte p75-Expression in der tieferen Dermis von Narben könnten Folge der bei Traumatisierung auftretenden Denervation sein. Nach Durchtrennung von sensorischen Nervenfasern wurde einerseits herabgesetzte NGF-R-Expression an epithelialen und im oberen Korium verlaufenden Nervenfasern, andererseits erhöhte NGF-R-Expression von Schwann-Zellen und von in der unteren Dermis befindlichen Nervenfasern beobachtet. NGF ist in dieser Situation unentbehrlich für die Neubildung von neuronalem Gewebe (Bothwell, 1997; Marshall *et al.*, 1990; Ribeiro-da-Silva *et al.*, 1991). Die innerhalb der perivaskulären Zellinfiltrate erhöhte p75-Expression könnte durch aktivierte Lymphozyten bedingt sein, die in Narben bis zu einem Jahr persistieren und durch NGF zur Sekretion koloniestimulierender Faktoren angeregt werden können (Borgognoni *et al.*, 1995; Bothwell, 1997; Yaar *et al.*, 1991). Soweit im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen

erkennbar, scheinen auch Endothelzellen den NGF-R p75 zu exprimieren, so daß NGF via p75 Einfluß auf die Gefäßneubildung nehmen könnte. Weitere Untersuchungen wären zur Klärung dieses Fragenkomplexes angezeigt.

Mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde untersucht, ob avidingefärbte Mastzellen jeweils in normaler Haut und in Narbengewebe den NGF-R p75 exprimieren. In normaler Haut exprimierten 70 % der durch die Avidinfärbung markierten Mastzellen den p75-NGF-R (Abb. 16). Vereinzelt im Narbengewebe identifizierte avidinpositive Mastzellen zeigten sämtlich keine Expression des p75-NGF-R (Tab. 10, S. 69).



**Abb. 16:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung desselben Ausschnitts mit Avidin (A) und anti-NGF-R-p75 (B), normale Haut, x 1000.

Die Expression des NGF-R Trk durch humane Mastzellen wurde mehrfach nachgewiesen (Henz *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 1997; Tam *et al.*, 1997; Welker *et al.*, 1998). Hingegen konnte eine Expression des p75-NGF-R auf humanen Mastzellen bisher nicht gezeigt werden (Nilsson *et al.*, 1997). In unserem Labor konnte eine sehr schwache Bande der p75-mRNA in HMC-1-Zellen nachgewiesen werden, jedoch kein Rezeptorprotein (Welker *et al.*, 1998). Die durch die Immunfluoreszenzdoppelfärbung in der vorliegenden Untersuchung erfolgte Darstellung des p75-NGF-R auf avidinpositiven Mastzellen in normaler Haut, nicht jedoch in Narben, könnte für eine ausgeprägte Beeinflussbarkeit der Expression durch Veränderungen des umgebenden Mikromilieus sprechen und die Schwierigkeit des Nachweises erklären.

**Tabelle 10:** Nachweis des p75-NGF-R und des GM-CSF-R auf avidinpositiven Mastzellen in normaler Haut und Narbengewebe. Die Anzahl (N) der jeweils ausgezählten avidinpositiven Mastzellen steht in Klammern.

	Normale Haut (N)	Narben (N)
<b>NGF-R-p75</b>	70% (153)	0% (einzelne)
<b>GM-CSF-R</b>	73% (125)	49% (39)

#### 4.3.3. GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor

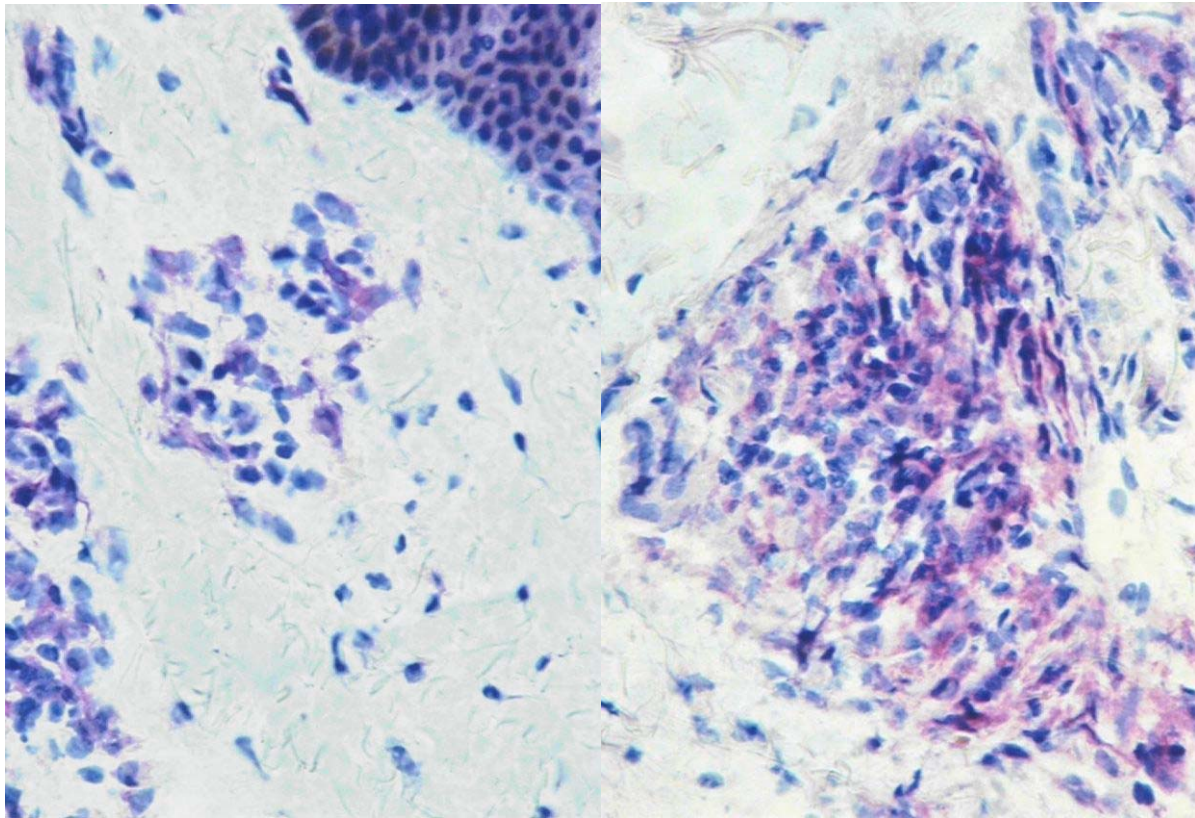
Wie NGF wurde auch GM-CSF immunhistochemisch nur von wenigen epidermalen und dermalen Zellen mit geringer Färbeintensität exprimiert ohne Unterschied zwischen normaler Haut und Narbengewebe (nicht gezeigt). GM-CSF-mRNA war ebenso jeweils in gleicher Menge vorhanden (nicht gezeigt).

Die Anzahl GM-CSF-R-exprimierender Zellen in Epidermis und Dermis normaler Haut war insgesamt spärlich (Tab. 8, S. 64). In Narben fand sich eine Vermehrung GM-CSF-R-positiver Zellen, die in der mittleren und tiefen Dermis Signifikanz erreichte und die in frischen Narben ( $\leq 35$  Tage) insbesondere im mittleren und tiefen Korium erheblich ausgeprägter als in älteren Narben ( $> 35 - 369$  Tage) war (Tab 11, S. 70; Abb. 17, S. 70). Hinsichtlich der mRNA für den GM-CSF-R ergab sich kein Unterschied zwischen Narbengewebe und normaler Haut (Tab. 9, S. 66; Abb. 15, S. 66).



**Tabelle 11:** : Anzahl GM-CSF-R-positiver Zellen in frischen ( $\leq 35$  Tage) und älteren Narben ( $> 35 - 369$  Tage). Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro 6,25 mm Länge (Epidermis) bzw. pro 0,0625 mm<sup>2</sup> (Dermis)  $\pm$  SD dar. \*  $p < 0,026$ .

Kompartiment	FrISChe Narben	Alte Narben
Epidermis	1,39 $\pm$ 0,62	1,79 $\pm$ 1,03
Obere Dermis	8,21 $\pm$ 3,74	3,86 $\pm$ 1,45
Mittlere Dermis	6,30 $\pm$ 3,39	3,82 $\pm$ 2,41
Untere Dermis	7,28 $\pm$ 4,63	0,70 $\pm$ 0,46*
Gesamte Dermis	7,13 $\pm$ 4,16	1,88 $\pm$ 1,41



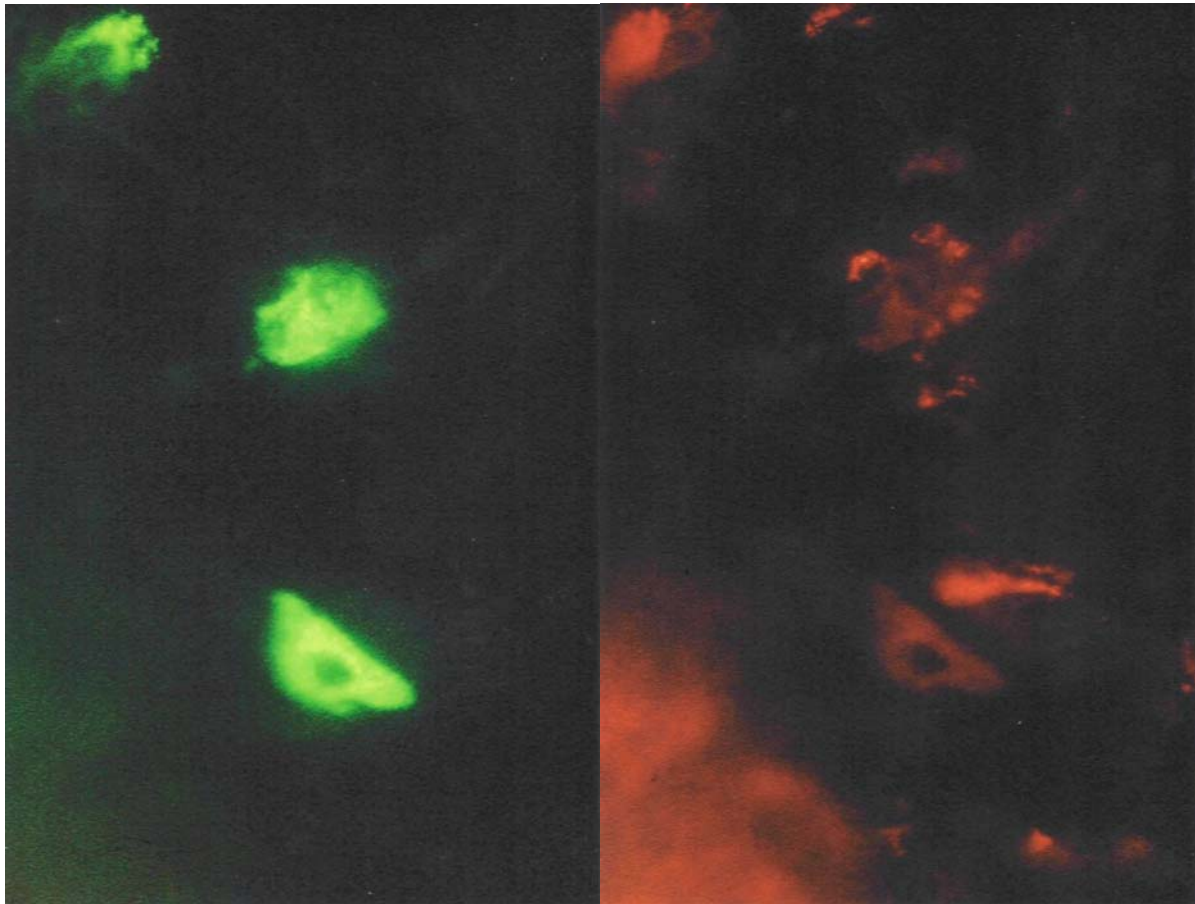
(A)

(B)

**Abb. 17:** Immunhistochemische Expression des GM-CSF-R in normaler Haut (A) und in Narbengewebe (B). APAAP-Färbung mit anti-GM-CSF-R, x 400.

GM-CSF wird nach Traumatisierung unter anderem von Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Monozyten, Mastzellen und Keratinozyten vermehrt freigesetzt. Außerdem wird die GM-CSF-Synthese von Keratinozyten und Fibroblasten durch bei Gewebstrauma freigesetztes IL-1 stimuliert (Braunstein *et al.*, 1994; Kaushansky *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1988). Daher ist erstaunlich, daß in dem hier untersuchten Narbengewebe GM-CSF nur von wenigen Zellen exprimiert wurde. Möglicherweise erstreckt sich die vermehrte GM-CSF-Sekretion nur über einen kürzeren Zeitraum nach Trauma, als hier erfaßt wurde. Die relativ geringe Präsenz von GM-CSF als Inhibitor der Mastzellentwicklung würde also eine ungestörte Mastzellreifung und -differenzierung im Narbengewebe begünstigen. Die vermehrte Expression des GM-CSF-R insbesondere in frischeren Narben läßt sich durch das in früheren Phasen der Wundheilung beziehungsweise Narbenbildung dichtere Entzündungsinfiltrat erklären. Darunter finden sich dendritische Zellen, Monozyten, Eosinophile, Neutrophile, und auch Mastzellen, die den GM-CSF-R exprimieren können (Borgognoni *et al.*, 1995). Sowohl in Narben, als auch in normaler Haut waren die Endothelzellen GM-CSF-R-positiv. Die migrations- und proliferationsfördernde Wirkung von GM-CSF auf Endothelien könnte bei Wundheilung und Vernarbung eine Rolle spielen, die sich jedoch zumindest aus den immunhistochemischen Befunden nicht ableiten läßt (Bussolino *et al.*, 1989; Bussolino *et al.*, 1991). Möglicherweise sind andere, z. T. von Mastzellen sezernierte Faktoren wie VEGF, TNF- $\alpha$ , Histamin, Heparin und Tryptase bedeutendere angiogenetische Faktoren nach Gewebstrauma (Artuc *et al.*, 1999; Grützkau *et al.*, 1998).

Mittels Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde untersucht, ob avidingefärbte Mastzellen jeweils in normaler Haut und in Narbengewebe den GM-CSF-R exprimieren. In der normalen Haut waren 73 % der avidingefärbten Mastzellen auch positiv für den GM-CSF-R, wohingegen von den im Narbengewebe insgesamt spärlich vorhandenen avidinmarkierten Mastzellen nur 49 % den GM-CSF-R exprimierten, unabhängig vom Narbenalter (Tab. 10, S. 69; Abb. 18, S. 72). Unsere Ergebnisse, die eine GM-CSF-R-Expression auf reifen avidinpositiven Mastzellen zeigen, stehen im Gegensatz zu bisherigen Erkenntnissen, nach denen Mastzellen im Verlauf des Reifungsprozesses den GM-CSF-R verlieren sollen (Valent, 1995). Die Herabregulation der GM-CSF-R-Expression auf avidingefärbten Mastzellen in Narben entspricht unseren Beobachtungen hinsichtlich c-Kit und p75-NGF-R, deren Expression auf avidinpositiven Mastzellen in Narben gleichfalls herabgesetzt war. Bindung von GM-CSF an seinen Rezeptor bewirkt eine Abnahme der Expression (Cannistra *et al.*, 1990; Kurata *et al.*, 1995). Hierdurch könnte eine Herunterregulation des GM-CSF-R erklärt werden.



(A9)

(CB)

**Abb. 18:** Immunfluoreszenzdoppelfärbung desselben Ausschnitts mit Avidin (A) und anti-GM-CSF-R (B), Narbengewebe, x 1000.

#### 4.3.4. TGF- $\beta$ und TGF- $\beta$ -Rezeptoren

Der für die Wundheilung als sehr wichtig betrachtete, ebenfalls von Mastzellen sezernierte Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 war immunhistochemisch insbesondere auf Keratinozyten, Fibroblasten, perivaskulären und Endothelzellen nachweisbar. Im Vergleich zu normaler Haut ließen sich sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis von Narben immunhistochemisch signifikant mehr Zellen mit dem TGF- $\beta$ 1-Antikörper anfärben bei insgesamt ausgeprägterer Färbeintensität (Tab. 12, S. 73). Ebenso war die mRNA-Expression von TGF- $\beta$ 1 in Narbengewebe signifikant hochreguliert gegenüber normaler Haut (Tab. 9, S. 66; Abb. 15, S. 66).



**Tabelle 12:** Immunhistochemische Expression von TGF $\beta$ 1 in normaler Haut versus Narbengewebe. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF  $\pm$  SD dar.

	Normale Haut	Narben	stat. sign. (p=)
Epidermis	72.64 $\pm$ 29.10	141.00 $\pm$ 68.48	0,0026
Obere Dermis	30.35 $\pm$ 14.80	120.48 $\pm$ 48.81	0,003
Mittlere und tiefe Dermis	4.81 $\pm$ 6.80	130.71 $\pm$ 79.66	0,00005

Auch für die beiden untersuchten TGF-Rezeptoren TGF- $\beta$ -R Typ I und II zeigte sich in Epidermis und Dermis von Narbengewebe eine im Vergleich zu normaler Haut vermehrte Expression in der Immunhistochemie. Hinsichtlich des TGF- $\beta$ -R Typ II war der Unterschied geringer als für den TGF- $\beta$ -R Typ I und nur in der mittleren und tiefen Dermis sowie in der Epidermis signifikant (Tab. 8, S. 64). Parallel dazu erwies sich die mRNA für beide Rezeptorproteine in Narben gegenüber normaler Haut signifikant erhöht (Tab. 9 und Abb. 15, S. 66). Wiederum war die Heraufregulation weniger ausgeprägt für den TGF- $\beta$ -R Typ II als für den TGF- $\beta$ -R Typ I.

Die vermehrte Präsenz von TGF- $\beta$  sowie seiner Rezeptoren in Narbengewebe entspricht der Erwartung, da dieses Molekül als fibroseinduzierendes Zytokin eine prominente Rolle im Bindegewebsmetabolismus einnimmt. In Haut von Patienten mit Morphea oder Sklerodermie im entzündlichen Stadium sowie in Fibroblasten von Keloiden fand sich gleichfalls eine erhöhte Expression von TGF- $\beta$  1 und 2 (Lee *et al.*, 1999; Querfeld *et al.*, 1999). Humane dermale Fibroblasten zeigten im Rahmen der Wundheilung eine Heraufregulation der TGF- $\beta$ -R Typ I und II mit Verringerung bei fortschreitendem Heilungsprozess, nicht jedoch im Fall der hypertrophen Narbenbildung (Schmid *et al.*, 1998).

Wir konnten auf humanen dermalen Mastzellen mittels FACS-Analyse die Expression beider TGF- $\beta$ -Rezeptoren zeigen in Übereinstimmung mit kürzlich publizierten, an HMC-1-Zellen erhobenen Befunden (Tab. 13, S. 74) (Olsson *et al.*, 2000). TGF- $\beta$  könnte somit zum einen mittels seiner Rezeptoren auf Mastzellen und zum anderen aufgrund seiner potenten chemotaktischen Wirkung auf Mastzellen zu ihrer Rekrutierung und Proliferation bei der Wundheilung beitragen (Gruber *et al.*, 1994).

**Tabelle 13:** FACS-Analyse von isolierten Mastzellen aus normaler Haut hinsichtlich der Expression der TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I und Typ II. Angabe des Prozentsatzes der rezeptorpositiven Zellen in bezug auf die untersuchten Zellen.

Isolierte Mastzellen aus normaler Haut	TGF- $\beta$ -R Typ I	TGF- $\beta$ -R Typ II
Probe 1	16 %	31 %
Probe 2	90 %	83 %

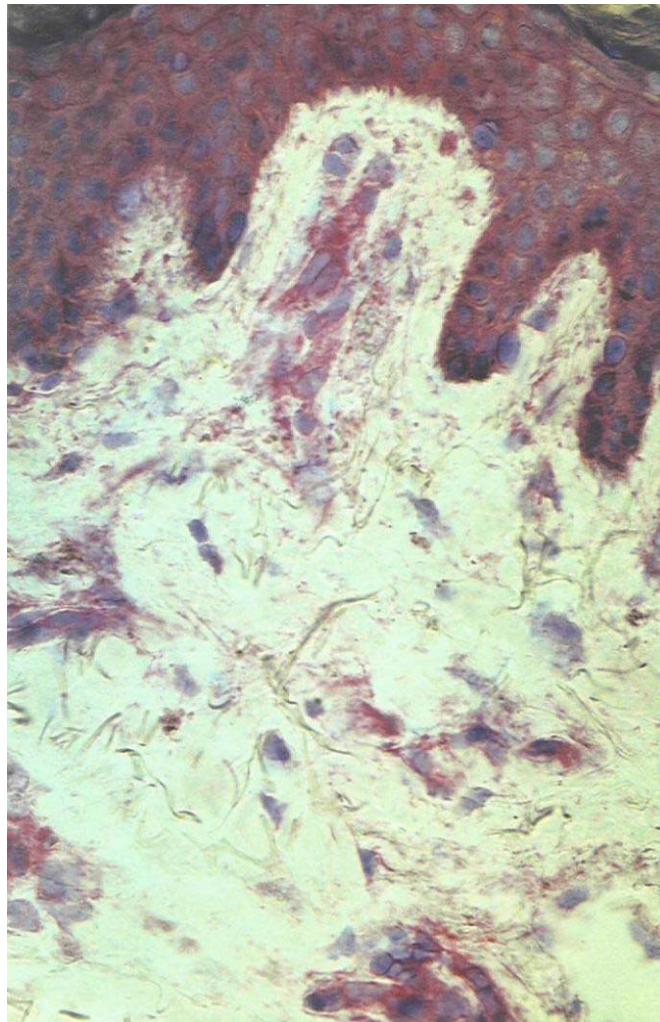
#### 4.4. Kutane Expression von Mastzellwachstums- sowie chemotaktischen Faktoren und Rezeptoren bei der Urtikaria

Ebenso wie bei Wundheilung und Narbenbildung zeigt sich auch bei der Urtikaria eine dermale Mastzellvermehrung, die sowohl in läsionaler, als auch in nicht-läsionaler Haut ca das 2,4 fache gegenüber normaler Haut beträgt und damit ausgeprägter als im Narbengewebe ist (s. 4.1.1 und 4.1.2) (Haas *et al.*, 1998b). Zahlreiche Untersuchungen wurden bei der Urtikaria hinsichtlich der inflammatorischen Mediatoren der Mastzellen durchgeführt, die die lokale und systemische Symptomatik auslösen. Über die Zytokine, die Proliferation, Differenzierung und Chemotaxis der Mastzelle selbst beeinflussen, liegen hinsichtlich der Urtikaria oder allergischer Reaktionen insgesamt praktisch keine Erkenntnisse vor.

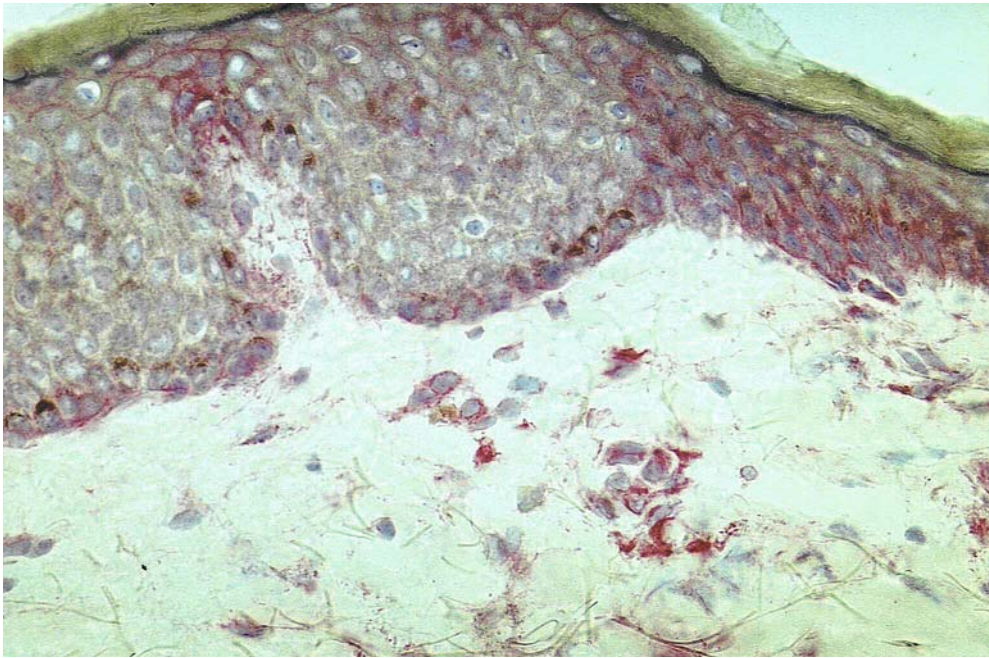
Wir haben einerseits proentzündliche Zytokine der Mastzelle (IL-3, IL-8, TNF $\alpha$ ), andererseits auch Mastzellwachstumsfaktoren und / oder ihre Rezeptoren (SCF, SCF-R, NGF-R-TrkA, NGF-R-p75, GM-CSF, GM-CSF-R) immunhistochemisch in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Patienten mit verschiedenen Urtikariaformen untersucht im Vergleich mit normaler Haut (s. unter 3.).

#### 4.4.1. SCF und SCF-Rezeptor

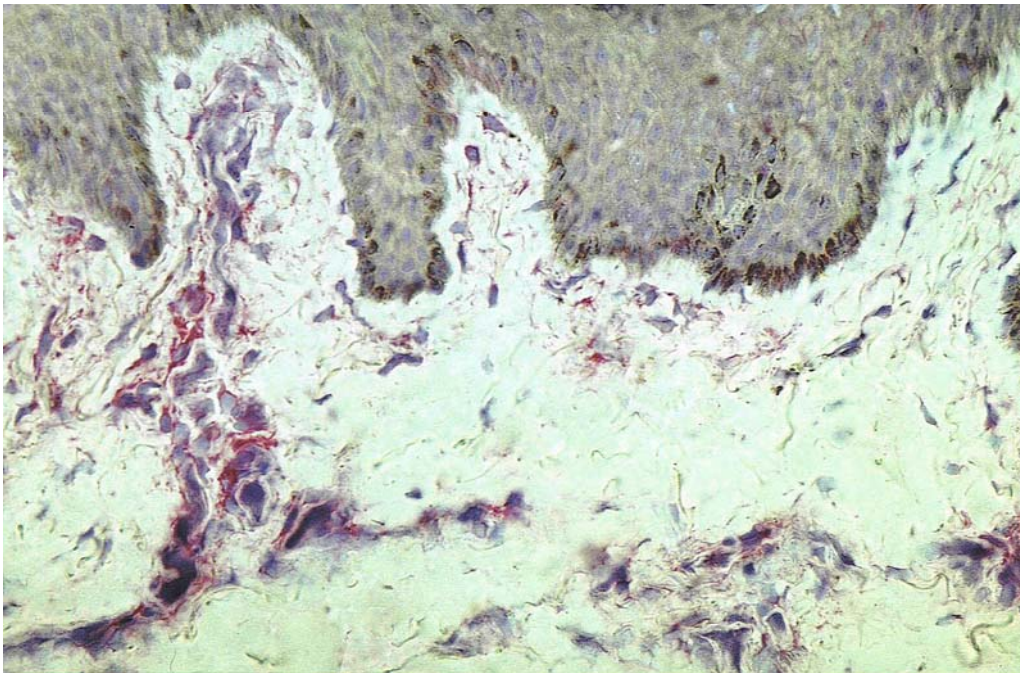
Im Vergleich zu ausgeprägter SCF-Expression der Epidermis normaler Haut zeigte die Epidermis läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten immunhistochemisch eine deutlich geringere Anfärbung mit dem SCF-Antikörper. Im Bereich des Follikelepithels war die Reaktivität bei den Urtikariapatienten ebenfalls geringer. In der Dermis exprimierten insbesondere Endothel- und perivaskuläre Zellen SCF. Auch hier ergab sich für läsionale und nicht-läsionale Urtikariahaut eine zum Teil signifikant erniedrigte Expression (Abb. 19; Abb. 20, S. 76; Tab. 14, S. 77).



**Abb. 19:** Immunhistochemische Expression von SCF in normaler Haut. APAAP-Färbung mit anti-SCF, x 400.



(A)



(B)

**Abb. 20:** SCF-Reaktivität bei der AU (A) und bei der DU (B), jeweils läSIONALE Haut. APAAP-Färbung mit anti-SCF, x 400.



**Tabelle 14:** Immunhistochemische epidermale und dermale Expression von SCF in normaler Haut und Urtikariabiopsien. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro 6,25 mm Länge (Epidermis) bzw. pro 0,0625 mm<sup>2</sup> (Dermis)  $\pm$  SD dar (N = 5).

	Urtikaria		Normale Haut
	läsional	nicht-läsional	
Epidermis	1,07 $\pm$ 0,73 <sup>x</sup>	1,43 $\pm$ 0,53 <sup>o</sup>	2,11 $\pm$ 0,23
Endothel	2,37 $\pm$ 0,49 <sup>+</sup>	2,29 $\pm$ 0,49 <sup>§</sup>	3,02 $\pm$ 0,08
Perivaskuläre und intersti- tielle Zellen	2,40 $\pm$ 0,51 <sup>*</sup>	2,43 $\pm$ 0,53 <sup>#</sup>	3,12 $\pm$ 0,53

p = <sup>x</sup> 0,0001, <sup>+</sup> 0,0005, <sup>§</sup> 0,004, <sup>\*</sup> 0,0021, <sup>o</sup> 0,01, <sup>#</sup> 0,06 im Vergleich zu normaler Haut.

C-Kit wurde in der Epidermis lediglich in der Basalzellschicht exprimiert. Bei den c-Kit-positiven epidermalen Zellen dürfte es sich um Melanozyten handeln, wie Dippel *et al.* anhand von Doppelfärbungen mit dem Melanosomenmarker TA99 und dem monoklonalen Antikörper YB5.B8 gegen c-Kit gezeigt haben (Dippel *et al.*, 1995). In der Dermis fanden sich c-Kit-positive Zellen perivaskulär und in der Umgebung der Hautanhangsgebilde, entsprechend der Lokalisation von Mastzellen. Signifikante Unterschiede der Zellzahlen zwischen normaler Haut und läsionaler sowie nicht-läsionaler Urtikariahaut ergaben sich nicht (nicht gezeigt).

SCF wurde sowohl in der Epidermis, als auch in der Dermis von läsionaler und nicht-läsionaler Urtikariahaut vermindert gegenüber normaler Haut angetroffen trotz Zunahme der Mastzellzahl. Nach IgE-mediierter Stimulation zeigen humane Lungenmastzellen *in vitro* eine innerhalb einer Minute komplette Histaminfreisetzung mit anschließendem Plateau über 60 bis 120 Minuten. Ebenfalls sezernierter SCF erreicht nach 3 - 15 Minuten ein Maximum und fällt allmählich über 30 bis 120 Minuten wieder ab (de Paulis *et al.*, 1999a). Möglicherweise ist hierfür eine rasche Spaltung des SCF durch auch bei der Mastzelldegranulation freigesetzte Proteasen wie Chymase verantwortlich (de Paulis *et al.*, 1999b). Hierdurch könnte die verminderte SCF-Expression bei der Urtikaria erklärbar sein. Weniger wahrscheinlich ist eine Rezeptor-Ligand-Internalisierung nach Bindung des SCF an seinen Rezeptor c-Kit (Shimizu *et al.*, 1996).

Ebenso wie die IgE-medierte Mastzellaktivierung führt auch Stimulierung der Mastzelle

durch SCF zu Produktion und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen (IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, RANTES), die sowohl bei der Soforttypreaktion wie der Urtikaria, als auch bei der Spätphasenreaktion und der chronischen allergischen Entzündung eine entscheidende Rolle spielen, wie am Beispiel des Bronchialsystems gezeigt wurde. Unterschiedliche Wege der Signaltransduktion werden bei diesen Formen der Mastzellaktivierung beschrieben mit möglicher therapeutischer Implikation (Lukasc *et al.*, 2000).

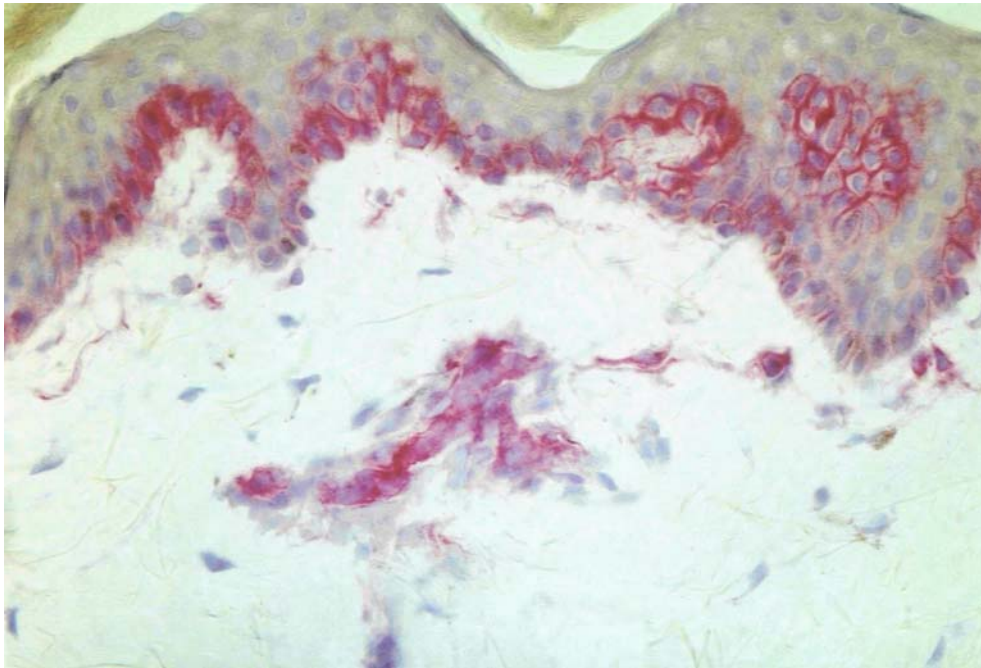
Im Gegensatz zum Urtikariagewebe ist SCF in Narben vermehrt vorhanden. Das mag einerseits durch die zahlreichen im Rahmen der Wundheilung und Narbenbildung aktivierten Zelltypen bedingt sein, die als Quelle für den SCF infrage kommen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen und Keratinozyten, andererseits durch die unterschiedliche Kinetik der beiden Prozesse mit konstanter, anhaltender Mastzellaktivierung bei der Narbenbildung und meist eher schubweiser, intensiver Stimulation bei der Urtikaria.

Wider Erwarten spiegelt sich die Erhöhung der Mastzellzahl bei der Urtikaria nicht in einem Anstieg der c-Kit-positiven Zellen, möglicherweise aufgrund einer Herabregulation der Rezeptorexpression. C-Kit-negative, avidinpositive Mastzellen haben wir in humanem Narbengewebe identifiziert. Auch in der Literatur werden C-Kit-negative Mastzellen beschrieben (Mayrhofer *et al.*, 1987). Mastzelldegranulation kann Rezeptorverlust bedingen. Zusätzlich führt Aktivierung der Mastzellen bei der Urtikaria zur Sekretion von IL-4, das die Herabregulation des c-Kit auf Mastzellen bewirken kann (Nilsson *et al.*, 1994b; Sillaber *et al.*, 1991). Vermutlich ist IL-4 als Komponente einer Immunantwort vom Th2-Typ in Urtikariagewebe im Vergleich zu Narben vermehrt vorhanden, so daß die Herabregulation des c-Kit auf Mastzellen entsprechend unseren Ergebnissen bei der Urtikaria deutlicher ausgeprägt ist als im Narbengewebe (Bischoff *et al.*, 1999; Bradding *et al.*, 1994; Lorentz *et al.*, 2000).

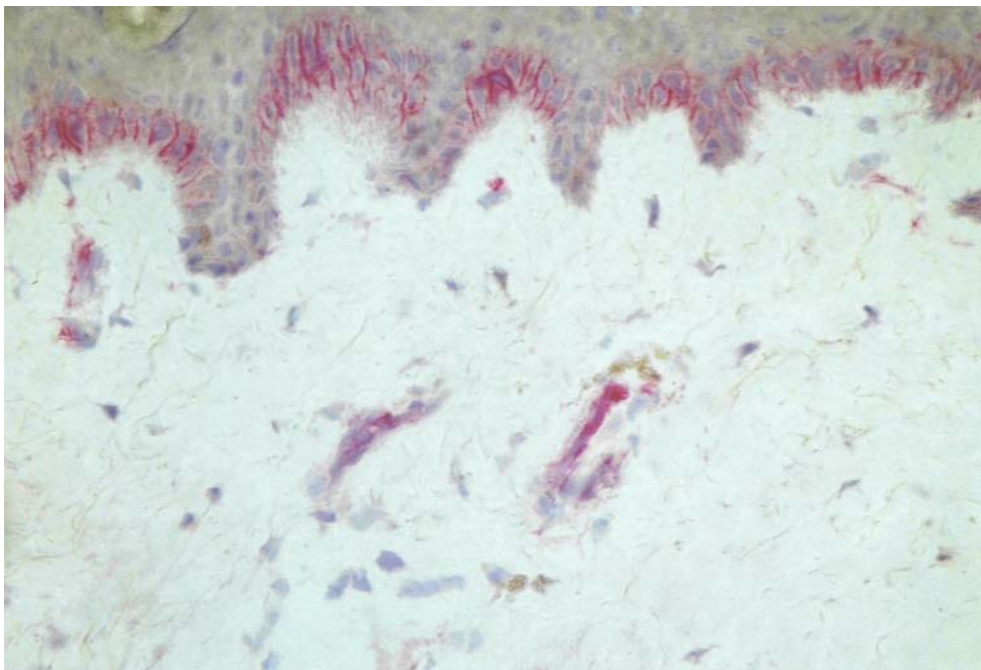
#### 4.4.2. NGF-Rezeptoren

NGF-R-p75 wurde in der Immunhistochemie von einigen basalen epidermalen Zellen exprimiert, und zwar gleichermaßen in Urtikariagewebe und normaler Haut. Unterschiede ergaben sich hier bei der endothelialen und perivaskulären p75-Expression in der Dermis, die jeweils

in läsionalem Urtikariagewebe signifikant vermindert war im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten und zu normaler Haut (Abb. 21; Tab. 15, S. 80).



(A)



(B)

**Abb. 21:** Immunhistochemische Expression des NGF-R-p75 in normaler Haut (A) und in läsionaler Haut bei der DU. APAAP-Färbung mit anti-NGF-R-p75, x 400.

**Tabelle 15:** Immunhistochemische dermale Expression des NGF-R-p75 in normaler Haut und Urtikariabiopsien. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro  $0,0625 \text{ mm}^2 \pm \text{SD}$  dar (N = 5).

	Endothelzellen	Perivaskuläre Zellen
AU	$1,61 \pm 0,55$	$0,22 \pm 0,44$ *
CRU	$1,42 \pm 0,53$	$0,21 \pm 0,45$ °
DU	$1,61 \pm 0,56$	$1,23 \pm 0,44$
Alle Urtikariaformen	$1,47 \pm 0,52$ *	$0,53 \pm 0,64$ +
Normale Haut	$2,02 \pm 0,14$	$1,22 \pm 0,64$

p = \* 0,002, ° 0,008, + 0,03 im Vergleich zu normaler Haut.

Der NGF-R-TrkA zeigte sich immunhistochemisch in der gesamten Epidermis exprimiert ohne Unterschiede zwischen läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten und normaler Haut. Auch die dermale Expression insbesondere auf Endothel- und perivaskulären Zellen zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (nicht gezeigt).

Ebenso wie SCF stellt NGF einen multifunktionalen Wachstumsfaktor dar mit Auswirkungen sowohl auf das neuronale Gewebe, als auch auf die Mastzelle sowie die Wundheilung ( s. 1.4.2.2). Außerdem gibt es Hinweise für eine Beteiligung des NGF bei allergischen Krankheiten, möglicherweise durch neuroimmunologischen Stress bei Störung der biologischen Homöostase ausgelöst. Bei Patienten mit allergischem Asthma, Rhinokonjunktivitis sowie Urtikaria und Angioödem fand sich im Serum eine signifikante Erhöhung der NGF-Werte, die mit den Gesamt-IgE-Werten im Serum korrelierten (Aloe *et al.*, 1997; Bonini *et al.*, 1996). NGF wird nicht nur von Mastzellen, sondern auch von Eosinophilen, weiteren Effektorzellen allergischer Immunantworten, produziert und führt zu deren Mediatorfreisetzung (Solomon *et al.*, 1998). Nach spezifischer IgE-mediierter Aktivierung, nicht jedoch nach Stimulation durch SCF und Lipopolysaccharide, sezernierten kultivierte humane und murine Mastzellen NGF (Xiang & Nilsson, 2000).



Auffällig hinsichtlich der NGF-R-Expression bei der Urtikaria ist eine immunhistochemisch erkennbare Herabregulation des NGF-R-p75 auf Endothel- und perivaskulären Zellen in läsionaler Urtikariahaut. Vor dem Hintergrund oben beschriebener, z. T. relativ neuer Erkenntnisse über eine Involvierung des NGF in immunologische Prozesse ist denkbar, daß ein bei der Urtikaria erhöhter Serumspiegel des NGF zu einer Herabregulation seines p75-Rezeptors in Endothel- und perivaskulären Zellen führen könnte. Über die Fragen, warum die Herabregulation nur in läsionaler Urtikariahaut geschieht und ob die unveränderte Expression des NGF-R-TrkA Ausdruck einer differentiellen Regulierung der NGF-Rezeptoren bei der Urtikaria ist, kann nur spekuliert werden. Ergänzende immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen müssen die vorliegenden Daten ergänzen.

#### 4.4.3. GM-SCF und GM-CSF-Rezeptor

GM-CSF und sein Rezeptor wurden immunhistochemisch weder bei der Urtikaria noch in normaler Haut von epidermalen Zellen exprimiert. Auch in der Dermis zeigte sich kein Unterschied zwischen den untersuchten Biopsien bei insgesamt geringer Expression dieses Wachstumsfaktors und seines Rezeptors auf perivaskulären Zellen (nicht gezeigt).

Obwohl der GM-CSF zahlreiche Auswirkungen auf Migration und Mediatorsekretion inflammatorischer Zellen wie Eosinophile und Neutrophile hat (Griffin *et al.*, 1990; Jones, 1993; Jyung *et al.*, 1994), haben wir in den Urtikariabiopsien weder Änderungen seiner Expression noch der seines Rezeptors feststellen können. Möglicherweise spielt hierfür die fehlende GM-CSF-Rezeptorexpression der reifen Mastzelle als Effektorzelle der Urtikaria eine Rolle (Valent, 1995). Bei unreifen Mastzellen wirkt GM-SCF inhibitorisch auf die Differenzierung (Welker *et al.*, 1997).

Die Literatur weist relativ wenige Untersuchungen zu GM-CSF und allergischen Entzündungen auf. Nach Bindung des IgE-Rezeptors produzierten humane Mastzellen *in vitro* GM-CSF. Humane Lungenmastzellen produzierten nach IgE-medierter Stimulation vermehrt GM-CSF, der zur Sekretion von ECP aus Eosinophilen führte, so daß GM-CSF ein Bindeglied zwischen Lungenmastzellen und chronischer allergischer Entzündung darstellen könnte (Bressler *et al.*, 1997; Okayama *et al.*, 1998). In der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinokonjunktivitis findet sich nach Allergenexposition ein Anstieg von Zellen, die mRNA für IL-

3, IL-4, IL-5 und GM-CSF exprimieren und bei positiver Korrelation zu der Anzahl Eosinophiler eine Rolle bei der Gewebseosinophilie zu spielen scheinen. Eine weitere Charakterisierung dieser Zellen erfolgte nicht. Nach oben dargelegten Beobachtungen ist gut vorstellbar, daß Mastzellen darunter sind (Durham *et al.*, 1992).

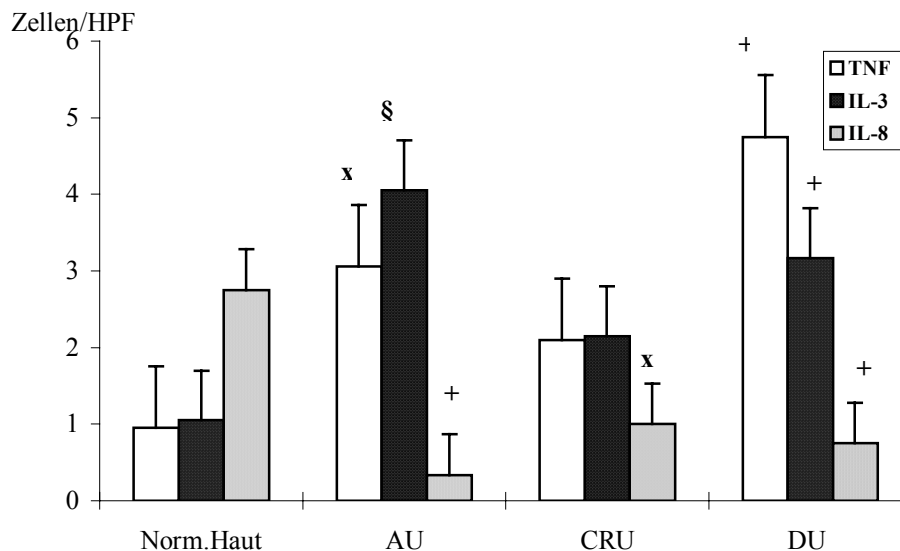
In Gegenwart von GM-CSF, IL-3 oder IL-5 kann PAF eine Histaminfreisetzung und eine Leukotrien C4-Synthese durch Basophile bewirken. Ebenfalls nach Zusatz von GM-CSF oder IL-3 wirkt der Komplementfaktor C3 als potenter Basophilenaktivator mit Auslösung einer Histaminausschüttung und Leukotriensynthese (Bischoff *et al.*, 1990; Brunner *et al.*, 1991). Beide Mechanismen könnten bei einer systemischen anaphylaktischen Reaktion eine Rolle spielen, jedoch weniger im Rahmen der Urtikaria, bei der die Mastzelle als Effektorzelle die zentrale Rolle spielt.

#### 4.5. Kutane Expression proinflammatorischer Zytokine bei der Urtikaria

##### 4.5.1. IL-3

Im Unterschied zur normalen Haut, in der immunhistochemisch keinerlei Expression von IL-3 in der Epidermis festzustellen war, fand sich in den Urtikariabiopsien eine Anfärbung der Basalmembranzzone mit dem IL-3-Antikörper (nicht gezeigt).

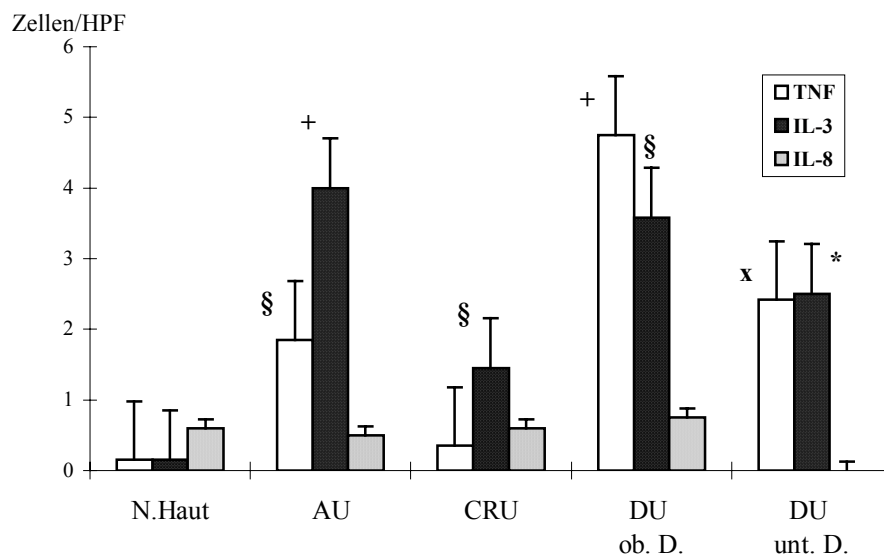
Im Vergleich zu einer eher schwachen IL-3-Immunreaktivität perivaskulärer Zellen in der Dermis normaler Haut zeigten diese Zellen bei der AU und DU in der oberen Dermis eine signifikant vermehrte IL-3-Expression. Bei der CRU und in der tiefen Dermis aller Urtikariaformen sowie in der nicht-läsionalen Haut der Urtikariapatienten ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 22, S. 83). Tendenziell ähnliche, aber weniger deutlich und nicht signifikant ausgeprägte Resultate ergaben sich für die interstitiellen Zellen im dermalen Bindegewebe.



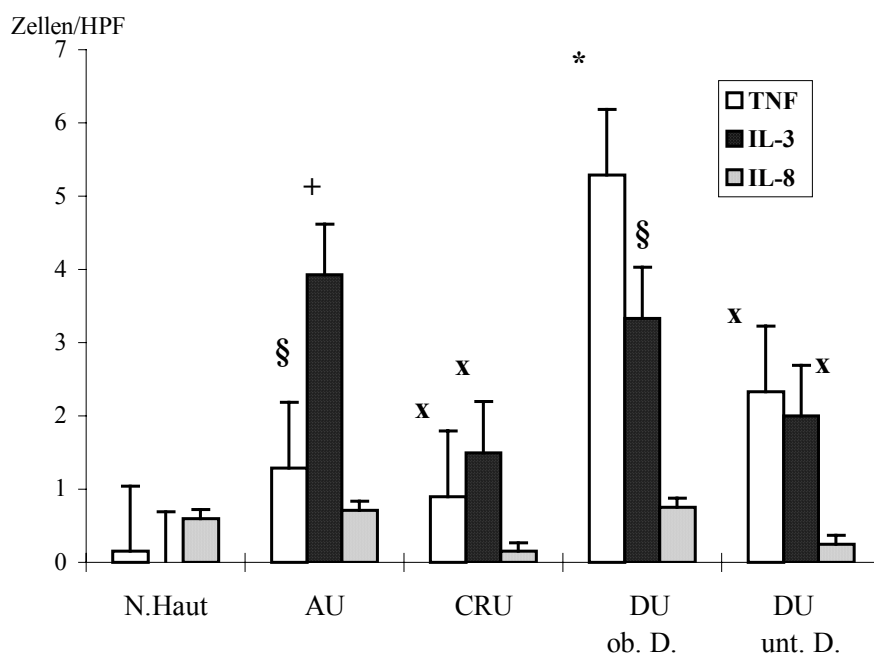
**Abb. 22:** Immunhistochemische TNF- $\alpha$ -, IL-3- und IL-8-Expression perivaskulärer Zellen in der oberen Dermis normaler Haut sowie läsionaler Haut von Urtikariapatienten. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF  $\pm$  SD dar.

<sup>x</sup>  $p < 0,05$ , <sup>§</sup>  $p < 0,01$ , <sup>+</sup>  $p < 0,001$  im Vergleich zu normaler Haut.

Der obere dermale Gefäßplexus wies bei allen untersuchten Urtikariaformen eine signifikant erhöhte endotheliale Expression von IL-3 auf, bemerkenswerterweise sowohl in läsionaler als auch in nichtläsionaler Haut. Diese Veränderungen waren am ausgeprägtesten bei der DU, wo sich zusätzlich auch im Bereich des tiefen dermalen Gefäßplexus eine signifikante Hochregulation von IL-3 fand, und am wenigsten ausgeprägt bei der CRU (Abb. 23, S. 84).



A)



B)

**Abb. 23:** Immunhistochemische TNF- $\alpha$ -, IL-3- und IL-8-Expression von Endothelzellen in der oberen Dermis normaler Haut sowie läsionaler (A) und nicht-läsionaler (B) Haut von Urtikariapatienten. Bei der DU wird neben der oberen Dermis (ob. D.) auch die untere Dermis (unt. D.) berücksichtigt. Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF  $\pm$  SD dar.

<sup>x</sup>  $p < 0,05$ , <sup>§</sup>  $p < 0,01$ , <sup>+</sup>  $p < 0,001$ , <sup>\*</sup>  $p < 0,0001$  im Vergleich zu normaler Haut.

In sequentiellen Biopsien eines Patienten mit Kälteurtikaria war die endotheliale IL-3-Expression 5 und 15 Minuten nach Kälteprovokation unverändert, stieg jedoch nach insgesamt 30 Minuten signifikant an. In Quaddeln nicht-atopischer Individuen mit positiver Pricktest-Reaktion auf Hausstaubmilbe ließ sich nach 15 Minuten keine signifikant veränderte IL-3-Expression der dermalen Endothelzellen nachweisen (Tab. 16).

**Tabelle 16:** Endotheliale Zytokin-Immunreaktivität in Urticae nach Pricktestung und in kontralateraler normaler Haut sowie in normaler Haut und provozierter Quaddel eines Patienten mit Kälteurtikaria 30 min nach Eiswürfelapplikation. (In den 5 und 15 min nach Eiswürfelapplikation entnommenen Biopsien war noch keine Vermehrung der endothelialen Zytokinreaktivität vorhanden.)

	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL-3</b>
<b>Urticae bei positivem Pricktest (N=7)</b>		
Normale Haut	0.83 $\pm$ 1.54	2.40 $\pm$ 2.37
Pricktest-Reaktion nach 15 min	1.72 $\pm$ 3.44	1.16 $\pm$ 0.66
<b>Kälteurtikaria (N=1)</b>		
Normale Haut	1.01 $\pm$ 0.98	5.31 $\pm$ 1.93
Provozierte Quaddel nach 30 min	4.36 $\pm$ 0.84*	13.00 $\pm$ 2.68*

Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF  $\pm$  SD dar. \*  $p < 0.0001$  im Vergleich zu normaler Haut.

Mithilfe des Wilcoxon-Rank-Testes untersuchten wir, ob eine Korrelation zwischen zytokin-positiven perivaskulären und interstitiellen dermalen Zellen und Mastzellzahlen in diesen Biopsien hergestellt werden konnte. Eine signifikante positive Korrelation ergab sich zwischen der Anzahl von IL-3-positiven Zellen und der von Mastzellen in den AU-, CRU- und DU-Biopsien ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

Da sich das Verteilungsmuster Tryptase-positiver Mastzellen in den Urtikariabiopsien von dem der Zytokin-positiven Zellen unterschied, ermittelten wir die Anzahl Tryptase-positiver und Zytokin-positiver Mastzellen in Serienschnitten und konnten nur wenige IL-3-positive Mastzellen bei der DU feststellen (s. Tab. 17, S. 86).

**Tabelle 17:** Prozentsatz Tryptase-positiver Zellen, die gleichzeitig mit Zytokin-Antikörpern (anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-3, anti-IL-8) reagieren, in Biopsien normaler Haut und verschiedener Urtikariaformen. Pro Biopsie wurden jeweils 500-1200 Mastzellen in Serienschnitten ausgewertet.

<b>anti-</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL-3</b>	<b>IL-8</b>
<b>AU</b> (N=9)	0.05	0.00	0.00
<b>CRU</b> (N=10)	0.06	0.01	0.00
<b>DU</b> (N=6)	0.05	0.06	0.01
<b>Normale Haut</b> (N=10)	0.00	0.00	0.00

Die Diskussion der IL-3-Immunreaktivität in den Urtikariabiopsien erfolgt unter der Überschrift TNF- $\alpha$  (s. unter 4.5.2) wegen des sich weitgehend entsprechenden Expressionsmusters von IL-3 und TNF- $\alpha$ .

#### 4.5.2. TNF- $\alpha$

In der Epidermis normaler Haut wurde TNF- $\alpha$  nur von einzelnen Zellen exprimiert im Gegensatz zur Urtikaria, wo die epidermale TNF- $\alpha$ -Expression sowohl in läsionaler, als auch in nicht-läsionaler Haut signifikant hochreguliert war (Tab. 18, S. 87).

Ebenso wie die IL-3-Expression war auch die TNF- $\alpha$ -Expression der perivaskulären Zellen in der oberen Dermis bei der AU und DU signifikant vermehrt im Vergleich mit normaler Haut (Abb. 22, S. 83). Bei der CRU und in der tiefen Dermis aller Urtikariaformen fanden sich keine signifikanten Veränderungen. In nicht-läsionaler Haut zeigte sich lediglich eine signifikant erhöhte perivaskuläre TNF- $\alpha$ -Expression in der oberen Dermis von Patienten mit DU. Im Bereich der dermalen interstitiellen Zellen ergab sich eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Expression bei der AU und bei der DU nur in der oberen Dermis.

**Tabelle 18:** Immunohistochemische Expression von TNF- $\alpha$  and IL-8 in der Epidermis normaler Haut sowie läsionaler und nicht-läsionaler Haut bei verschiedenen Urtikariaformen.

	TNFa		IL-8	
	läsional	nicht-läsional	läsional	nicht-läsional
<b>AU</b> (N=9)	$3.9 \pm 2.1^{\S}$	$3.6 \pm 1.8^{+}$	$6.5 \pm 2.9$	$5.4 \pm 2.0^x$
<b>CRU</b> (N=10)	$3.7 \pm 1.8^{+}$	$2.9 \pm 1.9^{\S}$	$8.1 \pm 2.0$	$6.8 \pm 3.3$
<b>DU</b> (N=6)	$4.7 \pm 1.4^{+}$	$4.8 \pm 1.4^{+}$	$6.7 \pm 2.9$	$6.6 \pm 2.1$
<b>Normale Haut</b> (N=10)		$0.6 \pm 0.8$		$7.8 \pm 1.6$

Die angegebenen Zellzahlen stellen MW pro HPF  $\pm$  SD dar.  $^x p < 0.05$ ;  $^{\S} p < 0.01$ ;  $^{+} p < 0.001$  im Vergleich zu normaler Haut.

Die Expression von TNF- $\alpha$  auf dermalen Endothelzellen verhielt sich bei allen untersuchten Urtikariaformen parallel zu der von IL-3 sowohl in läsionaler als auch in nichtläsionaler Haut (Abb. 23, S. 84). Auch in den sequentiellen Biopsien der Kälteurtikaria und in Quaddeln nicht-atopischer Individuen mit positiver Pricktest-Reaktion auf Hausstaubmilbe entsprachen die Veränderungen der endothelialen TNF- $\alpha$ -Expression denen der endothelialen IL-3-Expression (Tab. 16, S. 85).

Im Wilcoxon-Rank-Test ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen TNF- $\alpha$  - positiven perivaskulären und interstitiellen dermalen Zellen und Mastzellzahlen in den AU- und DU-Biopsien ( $p$  jeweils  $< 0,05$ ).

In Serienschnitten bestimmten wir die Anzahl Tryptase-positiver und Zytokin-positiver Mastzellen und konnten nur wenige TNF- $\alpha$ -positive Mastzellen in den Urtikariabiopsien feststellen (Tab. 17, S. 86). Dieser Befund steht in Widerspruch zu der Tatsache, daß TNF- $\alpha$  in Mastzellen präformiert vorhanden ist. Denkbar wäre eine Maskierung des intrazellulären TNF- $\alpha$  durch andere Substanzen, so daß er durch den Antikörper in der Immunhistochemie nicht erkannt wird.

Da die Expression von IL-3 und TNF- $\alpha$  in den untersuchten Biopsien zahlreiche Parallelitäten aufweist, wird in der folgenden Diskussion auf beide Zytokine eingegangen.

Die vorliegende Analyse der IL-3- und TNF- $\alpha$ -Immunreaktivität in der Haut von Urtikariapatienten deutet auf einen zentralen Part der Endothelzellen bei der Pathogenese der Urtikaria. Die Hochregulation von TNF- $\alpha$  in der Epidermis legt außerdem eine Rolle der Keratinozyten im Rahmen der Urtikaria nahe, wohingegen IL-3 und TNF- $\alpha$  aus Mastzellen kaum Bedeutung zu haben scheinen. Interessanterweise beschränken sich die Änderungen der IL-3- und TNF- $\alpha$ -Expression nicht auf die läsionale Haut, sondern betreffen in ähnlich ausgeprägter Form auch die nicht-läsionale Haut von Urtikariapatienten. Die Intensität der Immunreaktivität beider Zytokine entspricht dem Ausmaß des zellulären Entzündungsinfiltrates, das bei der AU und DU dichter ist als bei der CRU (Haas *et al.*, 1998b). Möglicherweise beeinflussen gegenregulatorische Prozesse den chronischen Krankheitsverlauf der CRU.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen vorausgegangener Untersuchungen, die auf die Bedeutung der Endothelzellen bei der Entstehung der Urtikaria hinweisen. So wurde eine Hochregulation von P-Selektin, ICAM-1 und ELAM-1 bei der Kälte- und cholinergischen Urtikaria gezeigt, eine Hochregulation von Molekülen der MHC-Klasse II bei mehreren Urtikariaformen, von P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 bei der Urticaria factitia, von E-Selektin bei der DU sowie von E-Selektin und ICAM-1 bei der Urticariavaskulitis (Barlow *et al.*, 1994; Haas *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 1998a; Kano *et al.*, 1998; Zuberbier *et al.*, 1997). Daß Mastzellprodukte, die bei der Degranulation freigesetzt werden, zu dieser Hochregulierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle beitragen, wurde durch in vivo- und in vitro-Studien an Ratten gezeigt. Mastzelldegranulation induzierte via Histamin und PAF P-Selektin-abhängiges sogenanntes Rollen der Leukozyten und CD18-abhängige Leukozytenadhäsion (Gaboury *et al.*, 1995). Da IL-3 und TNF- $\alpha$  auch die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle hochregulieren können, verstärken sie möglicherweise die Aktivierung der Endothelzellen und ihre eigene Expression auf diesen Zellen in einem positiven Rückkopplungsmechanismus (Khew-Goodall *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 1991).

Die der Quaddelbildung bei der Urtikaria zugrundeliegenden Pathomechanismen werden in der Dermis, speziell im Bereich der dermalen Gefäßplexus vermutet. Eine Beteiligung der Epidermis, wie wir sie für die TNF- $\alpha$ -Expression gefunden haben, wurde bisher nur bei der



AU beobachtet, bei der ebenfalls TNF- $\alpha$  und IL-6 immunhistochemisch und mittels RT-PCR in läsionaler Haut nachgewiesen wurden, nicht in nicht-läsionaler Haut. Bei parallel nachgewiesener Induktion der Expression des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 auf Keratinozyten bei der AU vermuten die Autoren einen IgE-vermittelten Prozess (Becherel *et al.*, 1997). In den meisten Fällen ist die Urtikaria jedoch nicht IgE-mediiert, so daß die Beteiligung auch anderer Stimuli zu vermuten ist (Henz *et al.*, 1998).

Bemerkenswert ist die signifikante Hochregulation von IL-3 und TNF- $\alpha$  in der nicht-läsionalen Haut von Urtikariapatienten. Abnorme Reaktivität und erhöhter Histamingehalt des Gewebes wurden gleichfalls in nicht-läsionaler Haut bei Urtikaria festgestellt, ebenso wie Hochregulation der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen,  $\beta$ 2-Integrinen, Molekülen der MHC-Klasse II und des eosinophilen MBP (letzteres nur bei der DU) sowie ein Anstieg der Mastzellzahlen (Haas *et al.*, 1995b; Haas *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 1995c; Haas *et al.*, 1998a; Haas *et al.*, 1998b; Kaplan *et al.*, 1978; Zuberbier *et al.*, 1997).

Obwohl Mastzellen nur gering zu der IL-3- und TNF- $\alpha$ -Expression bei der Urtikaria beizutragen scheinen, legt die positive Korrelation zwischen der Anzahl Tryptase-positiver Mastzellen und der Zytokin-positiver perivaskulärer und interstitieller dermaler Zellen nahe, daß beide Parameter in ähnlicher Weise mit der urtikariellen Entzündung zusammenhängen.

Die hinsichtlich der Expression von IL-3 und TNF- $\alpha$  erhobenen Befunde sprechen unter Berücksichtigung bereits bekannter Daten für folgende pathophysiologische Ereignisse bei der Urtikaria: Mastzellen schütten sowohl präformierte als auch neu generierte vasoaktive Mediatoren aus, die zu Vasodilatation, Verlangsamung des kapillären Blutflusses und Rollen der Leukozyten entlang des Endothels führen. Hochregulation und Aktivierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle und ihrer Liganden auf Leukozyten führen zum Anhaften der Leukozyten an die Gefäßwände und zu ihrer Einwanderung in die Gewebe, wo sie die lokale Quaddelreaktion durch eigene vasoaktive und chemotaktische Zytokine amplifizieren. Die Hochregulation von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen auch in Gefäßen nicht-läsionaler Haut spricht für eine ständige unterschwellige Aktivierung der Endothelzellen des gesamten Integuments durch zirkulierende Faktoren, beispielsweise Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Allergene, oder auch lösliche Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin (Kano *et al.*, 1998; Zuberbier *et al.*, 1997). Die dadurch erhöhte Reaktionsbereitschaft der dermalen Gefäße kann schon bei geringen oder unspezifischen Reizen zu Mastzellstimulation und damit über die beschriebenen Mechanismen

zur Quaddelbildung führen und den chronisch-rezidivierenden Charakter der Urtikaria erklären. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Art solcher zirkulierender Faktoren könnten zu Fortschritten auf dem Weg zu einer effizienten Urtikariatherapie führen.

#### 4.5.3. IL-8

In der Epidermis sowohl normaler Haut als auch aller Biopsien der Urtikariapatienten wurde IL-8 suprabasal kräftig exprimiert mit geringer Abnahme der Reaktivität bei der AU (Tab. 18, S. 87). Im Bereich der perivaskulären Zellen in der oberen Dermis zeigte sich in normaler Haut eine deutliche IL-8-Immunreaktivität mit signifikanter Abnahme in läsionaler Haut aller Urtikariaformen (Abb. 22, S. 83). Hinsichtlich der interstitiellen Bindegewebszellen in der Dermis ergaben sich keine signifikanten Änderungen der IL-8-Expression im Vergleich der untersuchten Gewebe.

Die endotheliale IL-8-Expression des oberen Gefäßplexus war insgesamt gering ohne signifikante Unterschiede der Expression in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten (Abb. 23, S. 84), in sequentiellen Biopsien einer Kälteurtikaria sowie in Pricktest-Reaktionen auf Hausstaubmilbe im Vergleich zur Expression in normaler Haut (nicht gezeigt).

Im Wilcoxon-Rank-Test war die Korrelation zwischen IL-8-positiven perivaskulären und interstitiellen dermalen Zellen und Mastzellzahlen signifikant negativ bei der AU ( $p = 0,017$ ), bei der CRU ( $p = 0,009$ ) und bei der DU ( $p < 0,025$ ). In Serienschnitten konnten wir praktisch keine Tryptase-positiven und zugleich IL-8-positiven Zellen in normaler Haut und in den Urtikariabiopsien feststellen (Tab. 17, S. 86).

Im Vergleich zu der Hochregulation von IL-3 und TNF- $\alpha$  in den Urtikariabiopsien ist der fehlende Anstieg der IL-8-Expression verwunderlich, insbesondere da IL-8 von stimulierten humanen Mastzellen *in vitro* reichlich sezerniert wird (Möller *et al.*, 1998; Möller *et al.*, 1993). Die epitheliale IL-8-Positivität entspricht den von anderen Autoren erhobenen Befunden in normaler Haut und bei inflammatorischen Hautkrankheiten, die unabhängig von der Herkunft des verwendeten monoklonalen Antikörpers waren (Macleod *et al.*, 1997; Sticherling *et al.*, 1991). Der monoklonale Antikörper gegen IL-8, der in unserer Studie benutzt wur-

de, soll eine nicht-funktionale, intrazellulär gespeicherte Form des IL-8-Moleküls nachweisen, das in seiner aktiven Form extrazellulär sezerniert wird (Schroder, 1995). Dadurch ließe sich die unsererseits beobachtete verminderte IL-8-Expression epidermaler und perivaskulärer Zellen bei der Urtikaria und die zuvor beschriebene geringere IL-8-Expression bei inflammatorischen Dermatosen erklären (Sticherling *et al.*, 1991). Weitere Untersuchungen mit Antikörpern, die das aktivierte IL-8-Molekül erkennen, wären zur Klärung der Rolle von IL-8 bei der Urtikaria ergänzend sinnvoll.

## 5. Zusammenfassende Betrachtung

Mastzellen sind seit langem als Effektorzellen von allergischen und Abwehrreaktionen sowie der Urtikaria identifiziert. Daneben gibt es zunehmende Hinweise für eine Beteiligung von Mastzellen an Wundheilung, Narbenbildung und anderen fibrosierenden Prozessen, einerseits wegen ihrer vielfältigen Interaktionen mit Fibroblasten, Entzündungszellen und extrazellulärer Matrix, andererseits aufgrund ihrer Fähigkeit, ein breites Spektrum an Mediatoren und Wachstumsfaktoren mit Einfluß auf das Bindegewebsgefüge zu sezernieren.

Ein Anstieg der Mastzellzahl wurde sowohl bei der Urtikaria, als auch bei fibrosierenden Prozessen in der Haut und in anderen Organen festgestellt. Die vorliegende Arbeit stellt den ersten Versuch dar, Mechanismen zu analysieren, die bei der Mastzellvermehrung in Rahmen von humanen Wundheilungsprozessen sowie bei der Urtikaria eine Rolle spielen könnten.

Erst seit wenigen Jahren wurden verschiedene Zytokine als Proliferations- und Differenzierungsfaktoren für Mastzellen identifiziert. SCF gilt als wichtiger proliferations- und entwicklungsfördernder Faktor für Mastzellen und ist wesentliches Ingrediens in Mastzellkulturen. Ebenso fördert NGF sowohl die Nagetier-, als auch die humane Mastzelldifferenzierung. Im Gegensatz dazu hemmt GM-CSF die Mastzelldifferenzierung. Seit kurzem ist bekannt, daß die Wachstumsfaktoren SCF und TGF- $\beta$  eine ausgeprägte chemotaktische Wirkung auf Mastzellen ausüben. Wegen dieser Effekte auf die Mastzelle haben wir die genannten Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren immunhistochemisch und zum Teil mittels RT-PCR in Narbengewebe, läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten sowie in normaler Haut untersucht.

In Narben waren bei im Vergleich zu normaler Haut erhöhten Mastzellzahlen erwartungsgemäß auch die c-Kit-exprimierenden Zellen in der Dermis vermehrt. Hingegen ergab sich trotz erhöhter Mastzellzahlen in Urtikariagewebe keine Zunahme der c-Kit-positiven dermalen Zellen, so daß bei der Urtikaria die c-Kit-Expression auf Mastzellen herabreguliert zu sein scheint, anders als im Narbengewebe.

Da SCF sowohl ein proliferations- und differenzierungsfördernder Mastzellwachstumsfaktor, als auch ein Chemoattraktor für diese Zellen ist, korrespondiert die Zunahme SCF-positiver

Zellen sowie der SCF-mRNA in Narbengewebe gegenüber normaler Haut mit der in Narben gefundenen Vermehrung von Mastzellen. In Narben kommen verschiedene, durch proinflammatorische Stimuli aktivierte Zellen als Quellen für die SCF-Sekretion infrage. Ein ähnlicher Anstieg SCF-positiver Zellen wäre analog auch in der Urtikariahaut zu vermuten gewesen. Überraschenderweise zeigte sich jedoch die epidermale und dermale Expression von SCF in läsionaler und nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten immunhistochemisch sogar vermindert im Vergleich zu normaler Haut.

Beide NGF-R (TrkA und p75) waren in Narbengewebe im Vergleich zu normaler Haut vermehrt vorhanden, sowohl immunhistochemisch als auch in der RT-PCR. Bei der Urtikaria war die immunhistochemisch untersuchte TrkA-NGF-R-Expression in den untersuchten Geweben gleich, die endotheliale und perivaskuläre p75-NGF-R-Expression jedoch in läsionaler im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut von Urtikariapatienten und zu normaler Haut vermindert. Ein bei Urtikariapatienten laut Literatur erhöht gefundener NGF-Serumspiegel könnte zu einer Herabregulation des p75-Rezeptors führen.

NGF wurde immunhistochemisch und mittels semiquantitativer RT-PCR in Narbengewebe und normaler Haut untersucht. Unterschiede zwischen beiden Geweben hinsichtlich der NGF-Expression und der NGF-mRNA konnten bei insgesamt nur geringer Expression nicht konstatiert werden, was in Anbetracht seiner wundheilungsfördernden Eigenschaft verwunderlich ist. Hierfür mögen technische Gründe verantwortlich sein oder rascher Abbau des sezernierten NGF. Andererseits könnten auch geringere Mengen von NGF über seine vermehrt exprimierten Rezeptoren wirksam werden.

GM-CSF als Inhibitor der Mastzelldifferenzierung war sowohl in Narbengewebe, als auch in den Urtikariabiopsien und in normaler Haut immunhistochemisch nur gering exprimiert trotz vermehrter Freisetzung nach Traumatisierung und zahlreicher Auswirkungen auf Migration und Mediatorsekretion inflammatorischer Zellen. Möglicherweise spielt hier ebenso wie bei der Darstellung des NGF die Kinetik mit raschem Abbau des freigesetzten GM-CSF eine Rolle. Auch der GM-CSF-R war in allen Biopsien vergleichsweise spärlich exprimiert mit Ausnahme der Dermis frischer Narben, wahrscheinlich aufgrund des ausgeprägteren Entzündungsinfiltrates.

Wie SCF und sein Rezeptor waren TGF- $\beta$  und seine Typ I und II-Rezeptoren sowie ihre je-

weilige mRNA in Narbengewebe signifikant hochreguliert. Mittels FACS-Analyse konnten wir auf humanen dermalen Mastzellen die Expression beider TGF- $\beta$ -Rezeptoren zeigen, so daß TGF- $\beta$  über seine Rezeptoren auf Mastzellen und aufgrund seiner potenten chemotaktischen Wirkung auf Mastzellen zu ihrer Rekrutierung und Proliferation bei fibrosierenden Prozessen beitragen könnte.

Bei der Urtikaria haben wir außerdem proentzündliche und chemotaktische Zytokine (IL-3, TNF- $\alpha$ ) untersucht in Hinblick auf eine mögliche Funktion bei der Pathogenese der Urtikaria. Beide Zytokine zeigten sich auf dermalen Endothelzellen, z. T. auch auf perivaskulären Zellen, jedoch nicht auf Mastzellen, signifikant hochreguliert, und zwar sowohl in läsionaler, als auch in nicht-läsionaler Urtikariahaut im Vergleich zu normaler Haut. Diese Befunde sprechen für eine Schlüsselfunktion nicht nur der Mastzelle, sondern auch der Endothelzelle bei der Urtikaria, die durch zirkulierende Faktoren unschwellig aktiviert zu sein scheint, so daß sie bereits auf geringe Reize reagiert.

Die aufgeführten Befunde legen unterschiedliche Regulationsmuster der Mastzellproliferation und -differenzierung bei verschiedenen entzündlichen Krankheitsbildern nahe. Hierbei spielt möglicherweise die Kinetik der Mediatorfreisetzung eine Rolle, die bei der Urtikaria rasch erfolgt, bei der Wundheilung und Narbenbildung eher protrahiert. Histamin und präformierte Mediatoren werden innerhalb von Minuten sezerniert, neu gebildete Mediatoren zum Teil erst nach Stunden. Auch der Abbau der sezernierten Moleküle kann differentiell reguliert sein. So wäre beispielsweise als Erklärung der in den Urtikariabiopsien verminderten SCF-Expression eine rasche Spaltung des SCF durch bei der Mastzelldegranulation freigesetzte Proteasen wie Chymase denkbar. Weiterhin beeinflussen Rückkopplungsmechanismen die Mastzellfunktionen wie Mediatorsekretion und Rezeptorexpression. Unsere Ergebnisse legen nahe, daß bei Trauma Feedbackmechanismen über Wachstumsfaktoren wie SCF, TGF- $\beta$  und NGF und ihre Rezeptoren ablaufen, bei der Urtikaria vorzugsweise via Interaktion von Mast- und Endothelzellen.

Mastzellheterogenität beim Menschen manifestiert sich einerseits durch unterschiedlichen Gehalt an Proteasen, wie in unseren Untersuchungen durch die Analyse der Mastzellsubpopulationen in Narbengewebe bestätigt werden konnte. Andererseits konnten wir in entzündlichen Hautkrankheiten unterschiedlicher Prägung zusätzlich eine Heterogenität des Zytokinrezeptorprofils von Mastzellen in Verbindung mit unterschiedlicher Zytokinexpression im um-

gebenden Mikromilieu zeigen.

Die vorliegende Arbeit trägt zur Charakterisierung der humanen Mastzelle bei, die erst in den letzten 10 Jahren nach dem Nachweis ihrer Abstammung aus dem Knochenmark und nach der Etablierung von Zellkulturen weiteren Untersuchungen zugänglich wurde. Sie ergänzt bisherige in vitro gewonnene Daten durch Aufzeigen der differentiellen Regulation der Mastzelle bei entzündlichen Hautkrankheiten in vivo. Die Ergebnisse unterstreichen die Vielseitigkeit der Mastzelle, die durch ihren Reichtum an Mediatoren und Rezeptoren eine hervorragende Rolle im Netzwerk proinflammatorischer Zellen einnimmt. Daher erscheint es nicht nur für die Forschung zur Pathogenese von Hautkrankheiten, sondern auch für einen möglichen therapeutischen Nutzen angezeigt, das Verständnis der Funktionen der Mastzelle in weiterführenden Studien zu vertiefen.

## 6. Literatur

- Abraham, S.N. & Malaviya, R. (1997). Mast cells in infection and immunity. *Infect Immun*, 65, 3501-8.
- Akers, I.A., Parsons, M., Hill, M.R., Hollenberg, M.D., Sanjar, S., Laurent, G.J. & McAnulty, R.J. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278, L193-201.
- Algermissen, B. (1994). Die Mastzellproteasen Tryptase und Chymase: Vorkommen und potentielle modulatorische Wirkungen in entzündlichen Dermatosen. Inauguraldissertation, Freie Universität, Berlin.
- Algermissen, B., Bauer, F., Schadendorf, D., Kropp, J.D. & Czarnetzki, B.M. (1994). Analysis of mast cell subpopulations (MCT, MCTC) in cutaneous inflammation using novel enzyme-histochemical staining techniques. *Exp Dermatol*, 3, 290-7.
- Algermissen, B., Hermes, B., Feldmann-Boeddeker, I., Bauer, F. & Henz, B.M. (1999). Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol*, 8, 193-8.
- Aloe, L., Bracci-Laudiero, L., Bonini, S. & Manni, L. (1997). The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy*, 52, 883-94.
- Armbrust, T., Batusic, D., Ringe, B. & Ramadori, G. (1997). Mast cells distribution in human liver disease and experimental rat liver fibrosis. Indications for mast cell participation in development of liver fibrosis. *J Hepatol*, 26, 1042-54.
- Artuc, M., Hermes, B., Steckelings, U.M., Grützkau, A. & Henz, B.M. (1999). Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol*, 8, 1-16.
- Atkins, F.M. & Clark, R.A. (1987). Mast cells and fibrosis. *Arch Dermatol*, 123, 191-3.
- Baghestanian, M., Agis, H., Bevec, D., Bankl, H.C., Hofbauer, R., Kress, H.G., Butterfield, J.H., Muller, M.R., Ashman, L.K., Fureder, W., Willheim, M., Lechner, K. & Valent, P. (1996). Stem cell factor-induced downregulation of c-kit in human lung mast cells and HMC-1 mast cells. *Exp Hematol*, 24, 1377-86.
- Barlow, R.J., Ross, E.L., MacDonald, D., Black, A.K. & Greaves, M.W. (1994). Adhesion molecule expression and the inflammatory cell infiltrate in delayed pressure urticaria. *Br J Dermatol*, 131, 341-7.
- Becherel, P.A., Chosidow, O., Le Goff, L., Frances, C., Debre, P., Mossalayi, M.D. & Arock, M. (1997). Inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokine expression by human keratinocytes during acute urticaria. *Mol Med*, 3, 686-94.
- Bienenstock, J., Tomioka, M., Matsuda, H., Stead, R.H., Quinonez, G., Simon, G.T., Coughlin, M.D. & Denburg, J.A. (1987). The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 82, 238-43.
- Bischoff, S.C., de Weck, A.L. & Dahinden, C.A. (1990). Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6813-7.
- Bischoff, S.C., Sellge, G., Lorentz, A., Sebald, W., Raab, R. & Manns, M.P. (1999). IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8080-5.



- Bissonnette, E.Y., Enciso, J.A. & Befus, A.D. (1997). TGF-beta1 inhibits the release of histamine and tumor necrosis factor-alpha from mast cells through an autocrine pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16, 275-82.
- Blair, R.J., Meng, H., Marchese, M.J., Ren, S., Schwartz, L.B., Tonnesen, M.G. & Gruber, B.L. (1997). Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest*, 99, 2691-700.
- Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Angelucci, F., Magrini, L., Manni, L. & Aloe, L. (1996). Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10955-60.
- Borgognoni, L., Pimpinelle, N., Martini, L., Brandani, P. & Reali, U.M. (1995). Immunohistologic features of normal and pathologic scars: possible clues to pathogenesis. *Eur J Dermatol*, 5, 407-412.
- Bothwell, M. (1997). Neurotrophin function in skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2, 27-30.
- Boyle, M.D., Lawman, M.J., Gee, A.P. & Young, M. (1985). Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J Immunol*, 134, 564-8.
- Bradding, P., Mediawake, R., Feather, I.H., Madden, J., Church, M.K., Holgate, S.T. & Howarth, P.H. (1995a). TNF alpha is localized to nasal mucosal mast cells and is released in acute allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 25, 406-15.
- Bradding, P., Okayama, Y., Howarth, P.H., Church, M.K. & Holgate, S.T. (1995b). Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. *J Immunol*, 155, 297-307.
- Bradding, P., Roberts, J.A., Britten, K.M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C.H., Howarth, P.H. & Holgate, S.T. (1994). Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10, 471-80.
- Brambilla, P., Gioria, M., Brivio, R., Ferrari, E., Tramacere, P., Colombo, L., Sarto, C. & Mocarelli, P. (1993). Granulocyte-macrophage and macrophage colony stimulating factors elicit colonies of mast cells in mouse bone marrow agar culture. An electron microscope study. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 25, 239-46.
- Braunstein, S., Kaplan, G., Gottlieb, A.B., Schwartz, M., Walsh, G., Abalos, R.M., Fajardo, T.T., Guido, L.S. & Krueger, J.G. (1994). GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*, 103, 601-4.
- Bressler, R.B., Lesko, J., Jones, M.L., Wasserman, M., Dickason, R.R., Huston, M.M., Cook, S.W. & Huston, D.P. (1997). Production of IL-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by naive human mast cells activated by high-affinity IgE receptor ligation. *J Allergy Clin Immunol*, 99, 508-14.
- Bressler, R.B., Thompson, H.L., Keffer, J.M. & Metcalfe, D.D. (1989). Inhibition of the growth of IL-3-dependent mast cells from murine bone marrow by recombinant granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *J Immunol*, 143, 135-9.
- Breuhahn, K., Mann, A., Muller, G., Wilhelmi, A., Schirmacher, P., Enk, A. & Blessing, M. (2000). Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth Differ*, 11, 111-21.
- Bridges, A.G., Helm, T.N., Bergfeld, W.F., Lawlor, K.B. & Dijkstra, J. (1996). Interleukin-3-induced urticaria-like eruption. *J Am Acad Dermatol*, 34, 1076-8.
- Broxmeyer, H.E., Douglas, G.W., Hangoc, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L. & Boyse, E.A. (1989). Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem / progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3828.

- Brunner, T., de Weck, A.L. & Dahinden, C.A. (1991). Platelet-activating factor induces mediator release by human basophils primed with IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or IL-5. *J Immunol*, 147, 237-42.
- Brunner, T., Heusser, C.H. & Dahinden, C.A. (1993). Human peripheral blood basophils primed by interleukin 3 (IL-3) produce IL-4 in response to immunoglobulin E receptor stimulation. *J Exp Med*, 177, 605-11.
- Bussolino, F., Wang, J.M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C.J., Aglietta, M., Arese, P. & Mantovani, A. (1989). Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 337, 471-3.
- Bussolino, F., Ziche, M., Wang, J.M., Alessi, D., Morbidelli, L., Cremona, O., Bosia, A., Marchisio, P.C. & Mantovani, A. (1991). In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest*, 87, 986-95.
- Cairns, J.A. & Walls, A.F. (1996). Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Immunol*, 156, 275-83.
- Cairns, J.A. & Walls, A.F. (1997). Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts. *J Clin Invest*, 99, 1313-21.
- Cannistra, S.A., Groshek, P., Garlick, R., Miller, J. & Griffin, J.D. (1990). Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 93-7.
- Canturk, N.Z., Vural, B., Esen, N., Canturk, Z., Oktay, G., Kirkali, G. & Solakoglu, S. (1999). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on incisional wound healing in an experimental diabetic rat model. *Endocr Res*, 25, 105-16.
- Cartwright, M., Mikheev, A.M. & Heinrich, G. (1994). Expression of neurotrophin genes in human fibroblasts: differential regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Int J Dev Neurosci*, 12, 685-93.
- Caughey, G.H., Leidig, F., Viro, N.F. & Nadel, J.A. (1988). Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase. *J Pharmacol Exp Ther*, 244, 133-7.
- Chan, I.J. & Tharp, M.D. (1994). Rat mast cell protease I alters cell metabolism. *J Invest Dermatol*, 103, 84-7.
- Choi, K.L. & Claman, H.N. (1987). Mast cells, fibroblasts, and fibrosis. New clues to the riddle of mast cells. *Immunol Res*, 6, 145-52.
- Choi, K.L., Giorno, R. & Claman, H.N. (1987). Cutaneous mast cell depletion and recovery in murine graft-vs-host disease. *J Immunol*, 138, 4093-101.
- Claman, H.N. (1989). Mast cell changes in a case of rapidly progressive scleroderma-ultrastructural analysis. *J Invest Dermatol*, 92, 290-5.
- Claman, H.N. (1990). Mast cells and fibrosis. The relevance to scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am*, 16, 141-51.
- Claman, H.N., Choi, K.L., Sujansky, W. & Vatter, A.E. (1986). Mast cell "disappearance" in chronic murine graft-vs-host disease (GVHD)-ultrastructural demonstration of "phantom mast cells". *J Immunol*, 137, 2009-13.
- Costa, J.J., Demetri, G.D., Harrist, T.J., Dvorak, A.M., Hayes, D.F., Merica, E.A., Menchaca, D.M., Gringeri, A.J., Schwartz, L.B. & Galli, S.J. (1996). Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med*, 183, 2681-6.
- Czarnetzki, B.M., Figdor, C.G., Kolde, G., Vroom, T., Aalberse, R. & de Vries, J.E. (1984). Development of human connective tissue mast cells from purified blood monocytes. *Immunology*, 51, 549-54.

- Czarnetzki, B.M., Grabbe, J., Kolde, G., Krüger-Krasagakes, S., Welker, P. & Zuberbier, T. (1995). Mast cells in the cytokine network: the what, where from and what for. *Exp Dermatol*, *4*, 221-226.
- Czarnetzki, B.M., Hannich, D. & Niedorf, H. (1980). In-vitro studies on the development of rat peritoneal mast cells. *Immunobiology*, *156*, 470-6.
- Czarnetzki, B.M., Zwadlo-Klarwasser, G., Brocker, E.B. & Sorg, C. (1989). Immunohistochemical demonstration of migration inhibitory factor in different types of urticaria. *J Invest Dermatol*, *93*, 471-4.
- Da Costa, R.M., Ribeiro Jesus, F.M., Aniceto, C. & Mendes, M. (1999). Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose- ranging study of granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*, *7*, 17-25.
- Dastyh, J. & Metcalfe, D.D. (1994). Stem cell factor induces mast cell adhesion to fibronectin. *J Immunol*, *152*, 213-9.
- Dayton, E.T., Caulfield, J.P., Hein, A., Austen, K.F. & Stevens, R.L. (1989). Regulation of the growth rate of mouse fibroblasts by IL-3-activated mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol*, *142*, 4307-13.
- de Paulis, A., Minopoli, G., Arbustini, E., de Crescenzo, G., Dal Piaz, F., Pucci, P., Russo, T. & Marone, G. (1999a). Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J Immunol*, *163*, 2799-808.
- de Paulis, A., Minopoli, G., Dal Piaz, F., Pucci, P., Russo, T. & Marone, G. (1999b). Novel autocrine and paracrine loops of the stem cell factor/chymase network. *Int Arch Allergy Immunol*, *118*, 422-5.
- DeKosky, S.T., Styren, S.D., ME, O.M., Goss, J.R., Kochanek, P., Marion, D., Evans, C.H. & Robbins, P.D. (1996). Interleukin-1 receptor antagonist suppresses neurotrophin response in injured rat brain. *Ann Neurol*, *39*, 123-7.
- Di Marco, E., Marchisio, P.C., Bondanza, S., Franzi, A.T., Cancedda, R. & De Luca, M. (1991). Growth-regulated synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor by human keratinocytes. *J Biol Chem*, *266*, 21718-22.
- Di Marco, E., Mathor, M., Bondanza, S., Cutuli, N., Marchisio, P.C., Cancedda, R. & De Luca, M. (1993). Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol Chem*, *268*, 22838-46.
- Dias-Baruffi, M., Pereira-da-Silva, G., Jamur, M.C. & Roque-Barreira, M.C. (1998). Heparin potentiates in vivo neutrophil migration induced by IL-8. *Glycoconj J*, *15*, 523-6.
- Dippel, E., Haas, N., Grabbe, J., Schadendorf, D., Hamann, K. & Czarnetzki, B.M. (1995). Expression of the c-kit receptor in hypomelanosis: a comparative study between piebaldism, naevus depigmentosus and vitiligo. *Br J Dermatol*, *132*, 182-9.
- Douglass, J., Dhami, D., Bulpitt, M., Lindley, I.J., Shute, J., Church, M.K. & Holgate, S.T. (1996). Intradermal challenge with interleukin-8 causes tissue oedema and neutrophil accumulation in atopic and non-atopic human subjects. *Clin Exp Allergy*, *26*, 1371-9.
- Durham, S.R., Ying, S., Varney, V.A., Jacobson, M.R., Sudderick, R.M., Mackay, I.S., Kay, A.B. & Hamid, Q.A. (1992). Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol*, *148*, 2390-4.
- Ehrhard, P.B., Ganter, U., Stalder, A., Bauer, J. & Otten, U. (1993). Expression of functional trk protooncogene in human monocytes [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Feb 1;91(3):1193]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*, 5423-7.

- Ehrlich, P. (1878). Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Doktorarbeit Universität Leipzig.
- Falanga, V., Soter, N.A., Altman, R.D. & Kerdell, F.A. (1990). Elevated plasma histamine levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Arch Dermatol*, 126, 336-8.
- Fang, K.C., Raymond, W.W., Blount, J.L. & Caughey, G.H. (1997). Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. *J Biol Chem*, 272, 25628-35.
- Fang, K.C., Raymond, W.W., Lazarus, S.C. & Caughey, G.H. (1996). Dog mastocytoma cells secrete a 92-kD gelatinase activated extracellularly by mast cell chymase. *J Clin Invest*, 97, 1589-96.
- Fang, K.C., Wolters, P.J., Steinhoff, M., Bidgol, A., Blount, J.L. & Caughey, G.H. (1999). Mast cell expression of gelatinases A and B is regulated by kit ligand and TGF-beta. *J Immunol*, 162, 5528-35.
- Farram, E. & Nelson, D.S. (1980). Mouse mast cells as anti-tumor effector cells. *Cell Immunol*, 55, 294-301.
- Födinger, M., Fritsch, G., Winkler, K., Emminger, W., Mitterbauer, G., Gadner, H., Valent, P. & Mannhalter, C. (1994). Origin of human mast cells: development from transplanted hematopoietic stem cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 84, 2954.
- Frandji, P., Tkaczyk, C., Oskeritzian, C., Lapeyre, J., Peronet, R., David, B., Guillet, J.G. & Mecheri, S. (1995). Presentation of soluble antigens by mast cells: upregulation by interleukin-4 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and downregulation by interferon-gamma. *Cell Immunol*, 163, 37-46.
- Fureder, W., Agis, H., Semper, H., Keil, F., Maier, U., Muller, M.R., Czerwenka, K., Hofler, H., Lechner, K. & Valent, P. (1995). Differential response of human basophils and mast cells to recombinant chemokines. *Ann Hematol*, 70, 251-8.
- Furitsu, T., Saito, H., Dvorak, A.M., Schwartz, L.B., Irani, A.M., Burdick, J.F., Ishizaka, K. & Ishizaka, T. (1989). Development of human mast cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 100039.
- Furitsu, T., Tsujimura, T., Tono, T., Ikeda, H., Kitayama, H., Koshimizu, U., Sugahara, H., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Kanayama, Y. & et al. (1993). Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*, 92, 1736-44.
- Gabbiani, G. (1994). Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract*, 190, 851-3.
- Gaboury, J.P., Johnston, B., Niu, X.F. & Kubes, P. (1995). Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion in vivo. *J Immunol*, 154, 804-13.
- Galli, S.J. (1990). New insights into "The riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest*, 62, 5-33.
- Galli, S.J. (1997). The Paul Kallos Memorial Lecture. The mast cell: a versatile effector cell for a challenging world. *Int Arch Allergy Immunol*, 113, 14-22.
- Galli, S.J., Tsai, M. & Wershil, B.K. (1993). The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am J Pathol*, 142, 965-74.
- Galli, S.J., Tsai, M., Wershil, B.K., Tam, S.Y. & Costa, J.J. (1995). Regulation of mouse and human mast cell development, survival and function by stem cell factor, the ligand for the c-kit receptor. *Int Arch Allergy Immunol*, 107, 51-3.
- Gordon, J.R. & Galli, S.J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature*, 346, 274-6.

- Gordon, J.R. & Galli, S.J. (1991). Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med*, 174, 103-7.
- Gordon, J.R. & Galli, S.J. (1994). Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 180, 2027-37.
- Gotis-Graham, I. & McNeil, H.P. (1997). Mast cell responses in rheumatoid synovium. Association of the MCTC subset with matrix turnover and clinical progression. *Arthritis Rheum*, 40, 479-89.
- Gottwald, T., Coerper, S., Schaffer, M., Koveker, G. & Stead, R.H. (1998). The mast cell-nerve axis in wound healing: a hypothesis. *Wound Repair Regen*, 6, 8-20.
- Grabarek, J., Groopman, J.E., Lyles, Y.R., Jiang, S., Bennett, L., Zsebo, K. & Avraham, H. (1994). Human kit ligand (stem cell factor) modulates platelet activation in vitro. *J Biol Chem*, 269, 21718-24.
- Grabbe, J., Haas, N. & Czarnetzki, B.M. (1994a). Die Mastzelle. *Hautarzt*, 45, 55-64.
- Grabbe, J., Welker, P., Dippel, E. & Czarnetzki, B.M. (1994b). Stem cell factor, a novel cutaneous growth factor for mast cells and melanocytes. *Arch Dermatol Res*, 287, 78-84.
- Grabbe, J., Welker, P., Rosenbach, T., Nurnberg, W., Kruger-Krasagakes, S., Artuc, M., Fiebiger, E. & Henz, B.M. (1996). Release of stem cell factor from a human keratinocyte line, HaCaT, is increased in differentiating versus proliferating cells. *J Invest Dermatol*, 107, 219-24.
- Greaves, M.W. (1992). Urticaria: new molecular insights and treatments. The Parkes Weber Lecture 1991. *J R Coll Physicians Lond*, 26, 199-203.
- Greenberg, G. & Burnstock, G. (1983). A novel cell-to-cell interaction between mast cells and other cell types. *Exp Cell Res*, 147, 1-13.
- Griffin, J.D., Cannistra, S.A., Sullivan, R., Demetri, G.D., Ernst, T.J. & Kanakura, Y. (1990). The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int J Cell Cloning*, 8 Suppl 1, 35-44; discussion 44-5.
- Gruber, B.L., Kew, R.R., Jelaska, A., Marchese, M.J., Garlick, J., Ren, S., Schwartz, L.B. & Korn, J.H. (1997). Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol*, 158, 2310-7.
- Gruber, B.L., Marchese, M.J. & Kew, R.R. (1994). Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol*, 152, 5860-7.
- Gruber, B.L., Marchese, M.J., Suzuki, K., Schwartz, L.B., Okada, Y., Nagase, H. & Ramamurthy, N.S. (1989). Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase. Dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J Clin Invest*, 84, 1657-62.
- Gruber, B.L. & Schwartz, L.B. (1990). The mast cell as an effector of connective tissue degradation: a study of matrix susceptibility to human mast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 171, 1272-8.
- Grützkau, A., Kruger-Krasagakes, S., Baumeister, H., Schwarz, C., Kogel, H., Welker, P., Lippert, U., Henz, B.M. & Möller, A. (1998). Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of VEGF206. *Mol Biol Cell*, 9, 875-84.

- Guillaume, T., Sekhavat, M., Rubinstein, D.B., Hamdan, O. & Symann, M.L. (1993). Transcription of genes encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, and interleukin 6 receptors and lack of proliferative response to exogenous cytokines in nonhematopoietic human malignant cell lines. *Cancer Res*, 53, 3139-44.
- Gupta, A.A., Leal-Berumen, I., Croitoru, K. & Marshall, J.S. (1996). Rat peritoneal mast cells produce IFN-gamma following IL-12 treatment but not in response to IgE-mediated activation. *J Immunol*, 157, 2123-8.
- Haas, N., Hamann, K., Grabbe, J., Algermissen, B. & Czarnetzki, B.M. (1995a). Phenotypic characterization of skin lesions in urticaria pigmentosa and mastocytomas. *Arch Dermatol Res*, 287, 242-8.
- Haas, N., Hamann, K., Grabbe, J., Cremer, B. & Czarnetzki, B.M. (1992). Expression of the high affinity IgE-receptor on human Langerhans' cells. Elucidating the role of epidermal IgE in atopic eczema. *Acta Derm Venereol*, 72, 271-2.
- Haas, N., Iwen, W., Grabbe, J., Hamann, K. & Czarnetzki, B.M. (1995b). Beta 2-integrins in different forms of urticaria. *Br J Dermatol*, 133, 48-53.
- Haas, N., Iwen, W., Grabbe, J., Uchanska-Ziegler, B. & Czarnetzki, B.M. (1996). MHC class II antigen expression is increased in different forms of urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*, 109, 177-82.
- Haas, N., Motel, K. & Czarnetzki, B.M. (1995c). Comparative immunoreactivity of the eosinophil constituents MBP and ECP in different types of urticaria. *Arch Dermatol Res*, 287, 180-5.
- Haas, N., Schadendorf, D. & Henz, B.M. (1998a). Differential endothelial adhesion molecule expression in early and late whealing reactions. *Int Arch Allergy Immunol*, 115, 210-4.
- Haas, N., Toppe, E. & Henz, B.M. (1998b). Microscopic morphology of different types of urticaria. *Arch Dermatol*, 134, 41-6.
- Haegerstrand, A., Jonzon, B., Dalsgaard, C.J. & Nilsson, J. (1989). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5993-6.
- Hartmann, K., Henz, B.M., Kruger-Krasagakes, S., Kohl, J., Burger, R., Guhl, S., Haase, I., Lippert, U. & Zuberbier, T. (1997). C3a and C5a stimulate chemotaxis of human mast cells. *Blood*, 89, 2863-70.
- Hartmann, T., Ruoss, S.J., Raymond, W.W., Seuwen, K. & Caughey, G.H. (1992). Human tryptase as a potent, cell-specific mitogen: role of signaling pathways in synergistic responses. *Am J Physiol*, 262, L528-34.
- Harvima, I.T., Naukkarinen, A., Harvima, R.J., Aalto, M.L., Neittaanmaki, H. & Horsmanheimo, M. (1990). Quantitative enzyme-histochemical analysis of tryptase- and chymase-containing mast cells in psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*, 282, 428-33.
- Harvima, I.T., Schechter, M.N., Harvima, R.J. & Fraki, J.E. (1988). Human skin tryptase: purification, partial characterization and comparison with human lung tryptase. *Biochim Biophys Acta*, 957, 71-80.
- Harvima, R.J., Harvima, I.T., Dull, D., Dunder, U.K. & Schwartz, L.B. (1999). Identification and characterization of multiple forms of tryptase from human mast cells. *Arch Dermatol Res*, 291, 73-80.
- Hawkins, R.A., Claman, H.N., Clark, R.A. & Steigerwald, J.C. (1985). Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann Intern Med*, 102, 182-6.
- Hebda, P.A., Collins, M.A. & Tharp, M.D. (1993). Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin*, 11, 685-96.

- Henz, B.M., Hermes, B. & Welker, P. (2000). Interactions between neurotrophins and mast cells. In *Mast cells and basophils*, Marone, G., Lichtenstein, L.M. & Galli, S.J. (eds) pp. 341-354. Academic Press: London, San Diego.
- Henz, B.M. & Zuberbier, T. (1998). Most chronic urticaria is food-dependent, and not idiopathic. *Exp Dermatol*, 7, 139-42.
- Henz, B.M. & Zuberbier, T. (2000). [Urticaria. New developments and perspectives]. *Hautarzt*, 51, 302-8.
- Henz, B.M., Zuberbier, T., Grabbe, J. & Monroe, E. (1998). *Urticaria - Clinical, diagnostic and therapeutic aspects*. Springer: Berlin.
- Hermes, B., Feldmann-Boddeker, I., Welker, P., Algermissen, B., Steckelings, M.U., Grabbe, J. & Henz, B.M. (2000). Altered expression of mast cell chymase and tryptase and of c-Kit in human cutaneous scar tissue. *J Invest Dermatol*, 114, 51-5.
- Hermes, B., Prochazka, A.K., Haas, N., Jurgovsky, K., Sticherling, M. & Henz, B.M. (1999). Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 307-14.
- Hiragun, T., Morita, E., Tanaka, T., Kameyoshi, Y. & Yamamoto, S. (1998). A fibrogenic cytokine, platelet-derived growth factor (PDGF), enhances mast cell growth indirectly via a SCF- and fibroblast-dependent pathway. *J Invest Dermatol*, 111, 213-7.
- Hirai, K., Morita, Y., Misaki, Y., Ohta, K., Takaishi, T., Suzuki, S., Motoyoshi, K. & Miyamoto, T. (1988). Modulation of human basophil histamine release by hemopoietic growth factors. *J Immunol*, 141, 3958-64.
- Hogaboam, C., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Taub, D.D., Lincoln, P., Standiford, T.J. & Lukacs, N.W. (1998). Novel role of transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. *J Immunol*, 160, 6166-71.
- Horsmanheimo, L., Harvima, I.T., Jarvikallio, A., Harvima, R.J., Naukkarinen, A. & Horsmanheimo, M. (1994). Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis. *Br J Dermatol*, 131, 348-53.
- Huang, C., Li, L., Krilis, S.A., Chanasyk, K., Tang, Y., Li, Z., Hunt, J.E. & Stevens, R.L. (1999). Human tryptases alpha and beta/II are functionally distinct due, in part, to a single amino acid difference in one of the surface loops that forms the substrate-binding cleft. *J Biol Chem*, 274, 19670-6.
- Huang, C., Wong, G.W., Ghildyal, N., Gurish, M.F., Sali, A., Matsumoto, R., Qiu, W.T. & Stevens, R.L. (1997). The tryptase, mouse mast cell protease 7, exhibits anticoagulant activity in vivo and in vitro due to its ability to degrade fibrinogen in the presence of the diverse array of protease inhibitors in plasma. *J Biol Chem*, 272, 31885-31893.
- Huang, E.J., Nocka, K.H., Buck, J. & Besmer, P. (1992). Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell*, 3, 349-62.
- Hutson, J.M., Niall, M., Evans, D. & Fowler, R. (1979). Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature*, 279, 793-795.
- Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., DeBlois, G. & Schwartz, L.B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4464-8.
- Irani, A.M., Goldstein, S.M., Wintroub, B.U., Bradford, T. & Schwartz, L.B. (1991). Human mast cell carboxypeptidase. Selective localization to MCTC cells. *J Immunol*, 147, 247-53.
- Irani, A.M., Gruber, B.L., Kaufman, L.D., Kahaleh, M.B. & Schwartz, L.B. (1992). Mast cell changes in scleroderma. Presence of MCT cells in the skin and evidence of mast cell activation. *Arthritis Rheum*, 35, 933-9.

- Irani, A.M. & Schwartz, L.B. (1989). Mast cell heterogeneity. *Clin Exp Allergy*, 19, 143-55.
- Jarvikallio, A., Naukkarinen, A., Harvima, I.T., Aalto, M.L. & Horsmanheimo, M. (1997). Quantitative analysis of tryptase- and chymase-containing mast cells in atopic dermatitis and nummular eczema. *Br J Dermatol*, 136, 871-7.
- Jaschke, E., Zabernigg, A. & Gattringer, C. (1999). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol*, 38, 380-6.
- Jeziorska, M., McCollum, C. & Woolley, D.E. (1997). Mast cell distribution, activation, and phenotype in atherosclerotic lesions of human carotid arteries [published erratum appears in *J Pathol* 1997 Oct;183(2):248]. *J Pathol*, 182, 115-22.
- Jippo, T., Morii, E., Tsujino, K., Tsujimura, T., Lee, Y.M., Kim, D.K., Matsuda, H., Kim, H.M. & Kitamura, Y. (1997). Involvement of transcription factor encoded by the mouse *mi* locus (MITF) in expression of p75 receptor of nerve growth factor in cultured mast cells of mice. *Blood*, 90, 2601-8.
- Jones, T.C. (1993). The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *Eur J Cancer*, 29A Suppl 3, S10-3.
- Jyung, R.W., Wu, L., Pierce, G.F. & Mustoe, T.A. (1994). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: differential action on incisional wound healing [see comments]. *Surgery*, 115, 325-34.
- Kampgen, E., Koch, F., Heufler, C., Eggert, A., Gill, L.L., Gillis, S., Dower, S.K., Romani, N. & Schuler, G. (1994). Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp Med*, 179, 1767-76.
- Kano, Y., Orihara, M. & Shiohara, T. (1998). Cellular and molecular dynamics in exercise-induced urticarial vasculitis lesions [see comments]. *Arch Dermatol*, 134, 62-7.
- Kaplan, A.P., Horakova, Z. & Katz, S.I. (1978). Assessment of tissue fluid histamine levels in patients with urticaria. *J Allergy Clin Immunol*, 61, 350-4.
- Kaplan, G., Walsh, G., Guido, L.S., Meyn, P., Burkhardt, R.A., Abalos, R.M., Barker, J., Frindt, P.A., Fajardo, T.T., Celona, R. & et al. (1992). Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med*, 175, 1717-28.
- Kaushansky, K., Lin, N. & Adamson, J.W. (1988). Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest*, 81, 92-7.
- Kawamoto, K., Okada, T., Kannan, Y., Ushio, H., Matsumoto, M. & Matsuda, H. (1995). Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the *trk* proto-oncogene receptor. *Blood*, 86, 4638-44.
- Kendall, J.C., Li, X.H., Galli, S.J. & Gordon, J.R. (1997). Promotion of mouse fibroblast proliferation by IgE-dependent activation of mouse mast cells: role for mast cell tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1. *J Allergy Clin Immunol*, 99, 113-23.
- Khew-Goodall, Y., Butcher, C.M., Litwin, M.S., Newlands, S., Korpelainen, E.I., Noack, L.M., Berndt, M.C., Lopez, A.F., Gamble, J.R. & Vadas, M.A. (1996). Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood*, 87, 1432-8.
- Kihira, C., Mizutani, H., Asahi, K., Hamanaka, H. & Shimizu, M. (1998). Increased cutaneous immunoreactive stem cell factor expression and serum stem cell factor level in systemic scleroderma. *J Dermatol Sci*, 20, 72-8.



- Kirshenbaum, A.S., Goff, J.P., Dreskin, S.C., Irani, A.M., Schwartz, L.B. & Metcalfe, D.D. (1989). IL-3-dependent growth of basophil-like cells and mastlike cells from human bone marrow. *J Immunol*, *142*, 2424-9.
- Kirshenbaum, A.S., Kessler, S.W., Goff, J.P. & Metcalfe, D.D. (1991). Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol*, *146*, 1410.
- Kischer, C.W., Bunce, H.d. & Shetlah, M.R. (1978). Mast cell analyses in hypertrophic scars, hypertrophic scars treated with pressure and mature scars. *J Invest Dermatol*, *70*, 355-7.
- Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J.S. & Gleich, G.J. (1991). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J Exp Med*, *174*, 745-8.
- Kitamura, Y., Shimada, M., Go, S., Matsuda, H., Hatanaka, K. & Seki, M. (1979). Distribution of mast-cell precursors in hematopoietic and lymphopoietic tissues of mice. *J Exp Med*, *150*, 482-90.
- Kofford, M.W., Schwartz, L.B., Schechter, N.M., Yager, D.R., Diegelmann, R.F. & Graham, M.F. (1997). Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem*, *272*, 7127-31.
- Kownatzki, E. & Norgauer, J. (1998). *Chemokines and skin*. Birkhäuser: Basel.
- Kruger-Krasagakes, S. & Czarnetzki, B.M. (1995). Cytokine secretion by human mast cells. *Exp Dermatol*, *4*, 250-4.
- Kupper, T.S., Lee, F., Birchall, N., Clark, S. & Dower, S. (1988). Interleukin 1 binds to specific receptors on human keratinocytes and induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein. A potential autocrine role for interleukin 1 in epidermis. *J Clin Invest*, *82*, 1787-92.
- Kurata, H., Arai, T., Yokota, T. & Arai, K. (1995). Differential expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-3 receptor subunits on human CD34+ cells and leukemic cell lines. *J Allergy Clin Immunol*, *96*, 1083-99.
- Kyrle, J. (1925). *Vorlesungen über Histo-Biologie der menschlichen Haut und ihrer Erkrankungen*. Vol. 1. Verlag von Julius Springer: Wien und Berlin.
- Lambiase, A., Manni, L., Bonini, S., Rama, P., Micera, A. & Aloe, L. (2000). Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*, 1063-9.
- Lawler, S., Candia, A.F., Ebner, R., Shum, L., Lopez, A.R., Moses, H.L., Wright, C.V. & Derynck, R. (1994). The murine type II TGF-beta receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-beta 1. *Development*, *120*, 165-75.
- Lawlor, F., Bird, C., Camp, R.D., Barlow, R., Barr, R.M., Kobza-Black, A., Judge, M.R. & Greaves, M.W. (1993). Increased interleukin 6, but reduced interleukin 1, in delayed pressure urticaria. *Br J Dermatol*, *128*, 500-3.
- Lawman, M.J., Boyle, M.D., Gee, A.P. & Young, M. (1985). Nerve growth factor accelerates the early cellular events associated with wound healing. *Exp Mol Pathol*, *43*, 274-81.
- Lawrence, D.A. (1996). Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw*, *7*, 363-74.
- Leal-Berumen, I., Conlon, P. & Marshall, J.S. (1994). IL-6 production by rat peritoneal mast cells is not necessarily preceded by histamine release and can be induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, *152*, 5468-76.
- Lee, T.Y., Chin, G.S., Kim, W.J., Chau, D., Gittes, G.K. & Longaker, M.T. (1999). Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg*, *43*, 179-84.

- Lees, M., Taylor, D.J. & Woolley, D.E. (1994). Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B. *Eur J Biochem*, *223*, 171-7.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. (1994). Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*, 3739-43.
- Levi-Schaffer, F. & Kupietzky, A. (1990). Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts into an in vitro wound. *Exp Cell Res*, *188*, 42-9.
- Levi-Schaffer, F. & Rubinchik, E. (1995). Activated mast cells are fibrogenic for 3T3 fibroblasts. *J Invest Dermatol*, *104*, 999-1003.
- Li, A.K., Koroly, M.J., Schattenkerk, M.E., Malt, R.A. & Young, M. (1980). Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*, 4379-81.
- Li, L., Macpherson, J.J., Adelstein, S., Bunn, C.L., Atkinson, K., Phadke, K. & Krilis, S.A. (1995). Conditioned media from a cell strain derived from a patient with mastocytosis induces preferential development of cells that possess high affinity IgE receptors and the granule protease phenotype of mature cutaneous mast cells. *J Biol Chem*, *270*, 2258-63.
- Li, L., Meng, X.W. & Krilis, S.A. (1996). Mast cells expressing chymase but not tryptase can be derived by culturing human progenitors in conditioned medium obtained from a human mastocytosis cell strain with c-kit ligand. *J Immunol*, *156*, 4839-44.
- Liebler, J.M., Qu, Z., Buckner, B., Powers, M.R. & Rosenbaum, J.T. (1998). Fibroproliferation and mast cells in the acute respiratory distress syndrome [see comments]. *Thorax*, *53*, 823-9.
- Lippert, U., Artuc, M., Grützkau, A., Möller, A., Kenderessy-Szabo, A., Schadendorf, D., Norgauer, J., Hartmann, K., Schweitzer-Stenner, R., Zuberbier, T., Henz, B.M. & Krüger-Krasagakes, S. (1998). Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J Immunol*, *161*, 2600-8.
- Lohi, J., Harvima, I. & Keski-Oja, J. (1992). Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72,000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem*, *50*, 337-49.
- Longley, B.J., Jr., Morganroth, G.S., Tyrrell, L., Ding, T.G., Anderson, D.M., Williams, D.E. & Halaban, R. (1993). Altered metabolism of mast-cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis. *N Engl J Med*, *328*, 1302-7.
- Longley, B.J., Tyrrell, L., Lu, S., Ma, Y., Klump, V. & Murphy, G.F. (1997a). Chronically KIT-stimulated clonally-derived human mast cells show heterogeneity in different tissue microenvironments [see comments]. *J Invest Dermatol*, *108*, 792-6.
- Longley, B.J., Tyrrell, L., Ma, Y., Williams, D.A., Halaban, R., Langley, K., Lu, H.S. & Schechter, N.M. (1997b). Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*, 9017-21.
- Lorentz, A., Schwengberg, S., Sellge, G., Manns, M.P. & Bischoff, S.C. (2000). Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol*, *164*, 43-8.
- Luger, T.A., Beissert, S. & Schwarz, T. (1997). The epidermal cytokine network. In *Skin immune system (SIS)*, Bos, J.D. (ed) pp. 271-310. CRC Press: Boca Raton.
- Lukasc, N.W., Oliveira, S.H. & Hogaboam, C.M. (2000). SCF-induced chemokine production, allergic airway inflammation and airway hyperreactivity. In *Mast cells and basophils*, Marone, G., Lichtenstein, L.M. & Galli, S.J. (eds) pp. Academic Press: London, San Diego. 609-621.
- Maas-Szabowski, N., Shimotoyodome, A. & Fusenig, N.E. (1999). Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism. *J Cell Sci*, *112*, 1843-53.

- Macleod, J.D., Anderson, D.F., Baddeley, S.M., Holgate, S.T., McGill, J.I. & Roche, W.R. (1997). Immunolocalization of cytokines to mast cells in normal and allergic conjunctiva. *Clin Exp Allergy*, 27, 1328-34.
- Malaviya, R. & Abraham, S.N. (2000). Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol*, 67, 841-6.
- Marshall, J.S., Gomi, K., Blennerhassett, M.G. & Bienenstock, J. (1999). Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoïd-dependent mechanism. *J Immunol*, 162, 4271-6.
- Marshall, J.S., Stead, R.H., McSharry, C., Nielsen, L. & Bienenstock, J. (1990). The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. I. Mechanism of action of nerve growth factor. *J Immunol*, 144, 1886-92.
- Matsuda, H., Kannan, Y., Ushio, H., Kiso, Y., Kanemoto, T., Suzuki, H. & Kitamura, Y. (1991). Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med*, 174, 7-14.
- Matsuda, H., Koyama, H., Sato, H., Sawada, J., Itakura, A., Tanaka, A., Matsumoto, M., Konno, K., Ushio, H. & Matsuda, K. (1998). Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med*, 187, 297-306.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff-Winiski, B., Jouvin, M.H., Kilgus, O., Kinet, J.P. & Stingl, G. (1994). Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med*, 179, 745-50.
- Maurer, M., Echtenacher, B., Hultner, L., Kollias, G., Mannel, D.N., Langley, K.E. & Galli, S.J. (1998). The c-kit ligand, stem cell factor, can enhance innate immunity through effects on mast cells. *J Exp Med*, 188, 2343-8.
- Mayrhofer, G., Gadd, S.J., Spargo, L.D. & Ashman, L.K. (1987). Specificity of a mouse monoclonal antibody raised against acute myeloid leukaemia cells for mast cells in human mucosal and connective tissues. *Immunol Cell Biol*, 65, 241-50.
- Meade, R., Neddermann, K.M., Greenfield, R.S., Braslawsky, G. & Bursucker, I. (1993). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plays a role in the functional activity of mast cells. *J Leukoc Biol*, 54, 523-7.
- Mekori, Y.A., Oh, C.K. & Metcalfe, D.D. (1993). IL-3-dependent murine mast cells undergo apoptosis on removal of IL-3. Prevention of apoptosis by c-kit ligand. *J Immunol*, 151, 3775-84.
- Mekori, Y.A., Oh, C.K. & Metcalfe, D.D. (1995). The role of c-Kit and its ligand, stem cell factor, in mast cell apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*, 107, 136-8.
- Metcalfe, D. (1998). Lineage commitment and maturation in hematopoietic cells: the case for extrinsic regulation. *Blood*, 92, 345.
- Metcalfe, D.D., Baram, D. & Mekori, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiol Rev*, 77, 1033-79.
- Miller, H.R., Wright, S.H., Knight, P.A. & Thornton, E.M. (1999). A novel function for transforming growth factor-beta1: upregulation of the expression and the IgE-independent extracellular release of a mucosal mast cell granule-specific beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Blood*, 93, 3473-86.
- Mitsui, H., Furitsu, T., Dvorak, A.M., Irani, A.M., Schwartz, L.B., Inagaki, N., Takei, M., Ishizaka, K., Zsebo, K.M., Gillis, S. & et al. (1993). Development of human mast cells from umbilical cord blood cells by recombinant human and murine c-kit ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 735-9.
- Möller, A., Henz, B.M., Grützkau, A., Lippert, U., Aragane, Y., Schwarz, T. & Krüger-Krasagakes, S. (1998). Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. *Immunology*, 93, 289-95.

- Möller, A., Lippert, U., Lessmann, D., Kolde, G., Hamann, K., Welker, P., Schadendorf, D., Rosenbach, T., Luger, T. & Czarnetzki, B.M. (1993). Human mast cells produce IL-8. *J Immunol*, *151*, 3261-6.
- Nadel, J.A. (1991). Biology of mast cell tryptase and chymase. *Ann N Y Acad Sci*, *629*, 319-331.
- Nilsson, G., Butterfield, J.H., Nilsson, K. & Siegbahn, A. (1994a). Stem cell factor is a chemotactic factor for human mast cells. *J Immunol*, *153*, 3717-23.
- Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallbook, F., Nilsson, K. & Metcalfe, D.D. (1997). Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol*, *27*, 2295-301.
- Nilsson, G., Miettinen, U., Ishizaka, T., Ashman, L.K., Irani, A.M. & Schwartz, L.B. (1994b). Interleukin-4 inhibits the expression of Kit and tryptase during stem cell factor-dependent development of human mast cells from fetal liver cells. *Blood*, *84*, 1519-27.
- Nilsson, G., Svensson, V. & Nilsson, K. (1995). Constitutive and inducible cytokine mRNA expression in the human mast cell line HMC-1. *Scand J Immunol*, *42*, 76-81.
- Nimer, S.D. & Uchida, H. (1995). Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. *Stem Cells*, *13*, 324-35.
- Nishijima, I., Watanabe, S., Nakahata, T. & Arai, K. (1997). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF)-dependent in vitro and in vivo proliferation and differentiation of all hematopoietic progenitor cells in hGM-CSF receptor transgenic mice. *J Allergy Clin Immunol*, *100*, S79-86.
- Nishikori, Y., Kakizoe, E., Kobayashi, Y., Shimoura, K., Okunishi, H. & Dekio, S. (1998). Skin mast cell promotion of matrix remodeling in burn wound healing in mice: relevance of chymase. *Arch Dermatol Res*, *290*, 553-60.
- Ohtsuka, T. (2000). Different interaction of mast cells with human endothelial cells and fibroblasts. *Eur J Dermatol*, *10*, 115-21.
- Okayama, Y., Kirshenbaum, A.S. & Metcalfe, D.D. (2000). Expression of a functional high-affinity IgG receptor, Fc gamma RI, on human mast cells: Up-regulation by IFN-gamma. *J Immunol*, *164*, 4332-9.
- Okayama, Y., Kobayashi, H., Ashman, L.K., Dobashi, K., Nakazawa, T., Holgate, S.T., Church, M.K. & Mori, M. (1998). Human lung mast cells are enriched in the capacity to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to IgE-dependent stimulation. *Eur J Immunol*, *28*, 708-15.
- Oliveira, S.H., Faccioli, L.H., Cunha, F.Q. & Ferreira, S.H. (1996). Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. *Int Arch Allergy Immunol*, *111*, 244-52.
- Olsson, N., Piek, E., ten Dijke, P. & Nilsson, G. (2000). Human mast cell migration in response to members of the transforming growth factor-beta family. *J Leukoc Biol*, *67*, 350-6.
- Oster, W., Frisch, J., Nicolay, U. & Schulz, G. (1991). Interleukin-3. Biologic effects and clinical impact. *Cancer*, *67*, 2712-7.
- Ozkaptan, Y., Gerek, M., Simsek, S. & Deveci, S. (1997). Effects of fibroblast growth factor on the healing process of tympanic membrane perforations in an animal model. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl*, *1*, S2-5.
- Padawer, J. (1974). Mast cells: extended lifespan and lack of granule turnover under normal in vivo conditions. *Exp Mol Pathol*, *20*, 269-280.
- Park, H.S., Jung, K.S., Shute, J., Roberts, K., Holgate, S.T. & Djukanovic, R. (1997). Allergen-induced release of GM-CSF and IL-8 in vitro by nasal polyp tissue from atopic subjects prolongs eosinophil survival. *Eur Respir J*, *10*, 1476-82.

- Pawankar, R. & Ra, C. (1996). Heterogeneity of mast cells and T cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*, 98, S248-62.
- Pearson, M.E., Huff, J.C., Giorno, R.C., Panicheewa, S., Claman, H.N. & Steigerwald, J.C. (1988). Immunologic dysfunction in scleroderma: evidence for increased mast cell releasability and HLA-DR positivity in the dermis. *Arthritis Rheum*, 31, 672-7.
- Persinger, M.A., Lepage, P., Simard, J.P. & Parker, G.H. (1983). Mast cell numbers in incisional wounds in rat skin as a function of distance, time and treatment. *Br J Dermatol*, 108, 179-87.
- Pincelli, C., Sevigiani, C., Manfredini, R., Grande, A., Fantini, F., Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Ferrari, S., Cossarizza, A. & Giannetti, A. (1994). Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 103, 13-8.
- Qu, Z., Huang, X., Ahmadi, P., Stenberg, P., Liebler, J.M., Le, A.C., Planck, S.R. & Rosenbaum, J.T. (1998). Synthesis of basic fibroblast growth factor by murine mast cells. Regulation by transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and stem cell factor. *Int Arch Allergy Immunol*, 115, 47-54.
- Querfeld, C., Eckes, B., Huerkamp, C., Krieg, T. & Sollberg, S. (1999). Expression of TGF-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in localized and systemic scleroderma. *J Dermatol Sci*, 21, 13-22.
- Rabier, M.J., Farber, E.M. & Wilkinson, D.I. (1993). Neuropeptides modulate leukotriene B4 mitogenicity toward cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 100, 132-6.
- Reed, J.A., Albino, A.P. & McNutt, N.S. (1995). Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. *Lab Invest*, 72, 215-22.
- Ribeiro-da-Silva, A., Kenigsberg, R.L. & Cuello, A.C. (1991). Light and electron microscopic distribution of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the skin of the rat lower lip. *Neuroscience*, 43, 631-46.
- Rothenberg, M.E., Owen, W.F., Jr., Silberstein, D.S., Woods, J., Soberman, R.J., Austen, K.F. & Stevens, R.L. (1988). Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest*, 81, 1986-92.
- Rottem, M., Hull, G. & Metcalfe, D.D. (1994). Demonstration of differential effects of cytokines on mast cells derived from murine bone marrow and peripheral blood mononuclear cells. *Exp Hematol*, 22, 1147-55.
- Ruger, B., Dunbar, P.R., Hasan, Q., Sawada, H., Kittelberger, R., Greenhill, N. & Neale, T.J. (1994). Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Int J Exp Pathol*, 75, 397-404.
- Ruoss, S.J., Hartmann, T. & Caughey, G.H. (1991). Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblasts. *J Clin Invest*, 88, 493-9.
- Sawada, J., Itakura, A., Tanaka, A., Furusaka, T. & Matsuda, H. (2000). Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Blood*, 95, 2052-8.
- Schadendorf, D., Tiedemann, K.H., Haas, N. & Czarnetzki, B.M. (1991). Detection of human papillomaviruses in paraffin-embedded condylomata acuminata--comparison of immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 97, 549-54.
- Schechter, N.M., Irani, A.M., Sprows, J.L., Abernethy, J., Wintroub, B. & Schwartz, L.B. (1990). Identification of a cathepsin G-like proteinase in the MCTC type of human mast cell. *J Immunol*, 145, 2652-61.

- Schmid, P., Itin, P., Cherry, G., Bi, C. & Cox, D.A. (1998). Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol*, 152, 485-93.
- Schrader, J.W. (1986). The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes (interleukin 3). *Ann Rev Immunol*, 4, 205-230.
- Schroder, J.M. (1995). Inflammatory mediators and chemoattractants. *Clin Dermatol*, 13, 137-150.
- Schwartz, L.B., Irani, A.M., Roller, K., Castells, M.C. & Schechter, N.M. (1987). Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells. *J Immunol*, 138, 2611-5.
- Schwartz, L.B., Kawahara, M.S., Hugli, T.E., Vik, D., Fearon, D.T. & Austen, K.F. (1983). Generation of C3a anaphylatoxin from human C3 by mast cell tryptase. *J Immunol*, 130, 1891-1895.
- Schwartz, L.B., Lewis, R.A. & Austen, K.F. (1981). Tryptase from human pulmonary mast cells: purification and characterization. *J Biol Chem*, 256, 11939-11943.
- Seibold, J.R., Giorno, R.C. & Claman, H.N. (1990). Dermal mast cell degranulation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 33, 1702-9.
- Shimizu, Y., Ashman, L.K., Du, Z. & Schwartz, L.B. (1996). Internalization of Kit together with stem cell factor on human fetal liver-derived mast cells: new protein and RNA synthesis are required for reappearance of Kit. *J Immunol*, 156, 3443-9.
- Sigounas, G., Steiner, M. & Anagnostou, A. (1997). Synergism of hemopoietic growth factors on endothelial cell proliferation. *Angiology*, 48, 141-7.
- Sillaber, C., Sperr, W.R., Agis, H., Spanblochl, E., Lechner, K. & Valent, P. (1994). Inhibition of stem cell factor dependent formation of human mast cells by interleukin-3 and interleukin-4. *Int Arch Allergy Immunol*, 105, 264.
- Sillaber, C., Strobl, H., Bevec, D., Ashman, L.K., Butterfield, J.H., Lechner, K., Maurer, D., Bettelheim, P. & Valent, P. (1991). IL-4 regulates c-kit proto-oncogene product expression in human mast and myeloid progenitor cells. *J Immunol*, 147, 4224-8.
- Smith, P.D., Kuhn, M.A., Franz, M.G., Wachtel, T.L., Wright, T.E. & Robson, M.C. (2000). Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury [In Process Citation]. *J Surg Res*, 92, 11-7.
- Solomon, A., Aloe, L., Pe'er, J., Frucht-Pery, J., Bonini, S., Bonini, S. & Levi-Schaffer, F. (1998). Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 102, 454-60.
- Stack, M.S. & Johnson, D.A. (1994). Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J Biol Chem*, 269, 9416-9.
- Stagno, F., Guglielmo, P., Consoli, U., Fiumara, P., Russo, M. & Giustolisi, R. (1999). Successful healing of hydroxyurea-related leg ulcers with topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor [letter]. *Blood*, 94, 1479-80.
- Staiano-Coico, L., Khandke, L., Krane, J.F., Sharif, S., Gottlieb, A.B., Krueger, J.G., Heim, L., Rigas, B. & Higgins, P.J. (1990). TGF-alpha and TGF-beta expression during sodium-N-butyrate-induced differentiation of human keratinocytes: evidence for subpopulation-specific up-regulation of TGF-beta mRNA in suprabasal cells. *Exp Cell Res*, 191, 286-91.
- Steckelings, U.M., Artuc, M., Paul, M., Stoll, M. & Henz, B.M. (1996). Angiotensin II stimulates proliferation of primary human keratinocytes via a non-AT1, non-AT2 angiotensin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 229, 329-33.
- Sticherling, M., Bornscheuer, E., Schroder, J.M. & Christophers, E. (1991). Localization of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8-immunoreactivity in normal and psoriatic skin [see comments]. *J Invest Dermatol*, 96, 26-30.

- Sung, K.J., Chang, S.E., Paik, E.M., Lee, M.W. & Choi, J.H. (1999). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF- $\alpha$ . *Neuropeptides*, *33*, 435-46.
- Suzuki, A., Shioda, N., Maeda, T., Tada, M. & Ueno, N. (1994). A mouse TGF- $\beta$  type I receptor that requires type II receptor for ligand binding. *Biochem Biophys Res Commun*, *198*, 1063-9.
- Tal, M. & Liberman, R. (1997). Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci Lett*, *221*, 129-32.
- Tam, S.Y., Tsai, M., Yamaguchi, M., Yano, K., Butterfield, J.H. & Galli, S.J. (1997). Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood*, *90*, 1807-20.
- Thompson, H.L., Burbelo, P.D., Gabriel, G., Yamada, Y. & Metcalfe, D.D. (1991). Murine mast cells synthesize basement membrane components. A potential role in early fibrosis. *J Clin Invest*, *87*, 619-23.
- Tillie-Leblond, I., Gosset, P., Janin, A., Dalenne, R., Joseph, M., Wallaert, B. & Tonnel, A.B. (1994). Tumor necrosis factor- $\alpha$  release during systemic reaction in cold urticaria. *J Allergy Clin Immunol*, *93*, 501-9.
- Toppe, E., Haas, N. & Henz, B.M. (1998). Neutrophilic urticaria: clinical features, histological changes and possible mechanisms. *Br J Dermatol*, *138*, 248-53.
- Toru, H., Eguchi, M., Matsumoto, R., Yanagida, M., Yata, J. & Nakahata, T. (1998). Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood*, *91*, 187-95.
- Toth, T., Toth-Jakatics, R., Jimi, S., Ihara, M., Urata, H. & Takebayashi, S. (1999). Mast cells in rapidly progressive glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, *10*, 1498-505.
- Trautmann, A., Krohne, G., Brocker, E.B. & Klein, C.E. (1998). Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *J Immunol*, *160*, 5053-7.
- Tredget, E.E., Shankowsky, H.A., Pannu, R., Nedelec, B., Iwashina, T., Ghahary, A., Taerum, T.V. & Scott, P.G. (1998). Transforming growth factor- $\beta$  in thermally injured patients with hypertrophic scars: effects of interferon  $\alpha$ -2b. *Plast Reconstr Surg*, *102*, 1317-28; discussion 1329-30.
- Tsuboi, R., Sato, C., Shi, C.M. & Ogawa, H. (1992). Stimulation of keratinocyte migration by growth factors. *J Dermatol*, *19*, 652-3.
- Tsuda, T., Wong, D., Dolovich, J., Bienenstock, J., Marshall, J. & Denburg, J.A. (1991). Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood*, *77*, 971-9.
- Tuveri, M.A., Passiu, G., Mathieu, A. & Aloe, L. (1993). Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*, *11*, 319-22.
- Ure, I., Partsch, B., Wolff, K. & Petzelbauer, P. (1998). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases wound-fluid interleukin 8 in normal subjects but does not accelerate wound healing. *Br J Dermatol*, *138*, 277-82.
- Valent, P. (1995). Cytokines involved in growth and differentiation of human basophils and mast cells. *Exp Dermatol*, *4*, 255-9.
- Valent, P., Spanblochl, E., Sperr, W.R., Sillaber, C., Zsebo, K.M., Agis, H., Strobl, H., Geissler, K., Bettelheim, P. & Lechner, K. (1992). Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture. *Blood*, *80*, 2237-45.
- van Overveld, F.J., Jorens, P.G., Rampart, M., de Backer, W. & Vermeire, P.A. (1991). Tumour necrosis factor stimulates human skin mast cells to release histamine and

- tryptase. *Clin Exp Allergy*, 21, 711-4.
- Volc-Platzer, B., Valent, P., Radaszkiewicz, T., Mayer, P., Bettelheim, P. & Wolff, K. (1991). Recombinant human interleukin 3 induces proliferation of inflammatory cells and keratinocytes in vivo. *Lab Invest*, 64, 557-66.
- Wakefield, P.E., James, W.D., Samlaska, C.P. & Meltzer, M.S. (1991). Tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol*, 24, 675-85.
- Walsh, L.J., Trinchieri, G., Waldorf, H.A., Whitaker, D. & Murphy, G.F. (1991). Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 4220-4.
- Warringa, R.A., Koenderman, L., Kok, P.T., Kreukniet, J. & Bruijnzeel, P.L. (1991). Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood*, 77, 2694-700.
- Weber, S., Babina, M., Feller, G. & Henz, B.M. (1997). Human leukaemic (HMC-1) and normal skin mast cells express beta 2-integrins: characterization of beta 2-integrins and ICAM-1 on HMC-1 cells. *Scand J Immunol*, 45, 471-81.
- Weber, S., Ruh, B., Kruger-Krasagakes, S. & Czarnetzki, B.M. (1995). Adhesion molecules on the human mast cell line HMC-1 are upregulated during cell activation. *Arch Dermatol Res*, 287, 695-8.
- Weidner, N. & Austen, K.F. (1993). Heterogeneity of mast cells at multiple body sites. Fluorescent determination of avidin binding and immunofluorescent determination of chymase, tryptase, and carboxypeptidase content. *Pathol Res Pract*, 189, 156-62.
- Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T. & Henz, B.M. (1999). Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor. *Scand J Immunol*, 49, 495-500.
- Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T. & Henz, B.M. (2000a). Nerve growth factor-beta induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology*, 99, 418-26.
- Welker, P., Grabbe, J., Grützkau, A. & Henz, B.M. (1998). Effects of nerve growth factor (NGF) and other fibroblast-derived growth factors on immature human mast cells (HMC-1). *Immunology*, 94, 310-7.
- Welker, P., Grabbe, J., Zuberbier, T., Guhl, S. & Henz, B.M. (2000b). Mast cell and myeloid marker expression during early in vitro mast cell differentiation from human peripheral blood mononuclear cells. *J Invest Dermatol*, 114, 44-50.
- Welker, P., Grabbe, J., Zuberbier, T. & Henz, B.M. (1997). GM-CSF downregulates expression of tryptase, Fc epsilon RI and histamine in HMC-1 mast cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 113, 284-6.
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*, 61, 233-45.
- Wershil, B.K., Wang, Z.S., Gordon, J.R. & Galli, S.J. (1991). Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest*, 87, 446-53.
- Whetton, A.D. & Spooner, E. (1998). Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of haematopoietic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 721.
- Wichmann, B.E. (1955). The mast cell count during the process of wound healing: an experimental investigation on rats. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 108, 1-35.
- Wiesner-Menzel, L., Schulz, B., Vakilzadeh, F. & Czarnetzki, B.M. (1981). Electron microscopical evidence for a direct contact between nerve fibres and mast cells. *Acta Derm Venereol*, 61, 465-9.
- Wilkinson, D.I., Theeuwes, M.J. & Farber, E.M. (1994). Nerve growth factor increases the



- mitogenicity of certain growth factors for cultured human keratinocytes: a comparison with epidermal growth factor. *Exp Dermatol*, 3, 239-45.
- Williams, C.M. & Galli, S.J. (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 847-59.
- Xia, H.Z., Kepley, C.L., Sakai, K., Chelliah, J., Irani, A.M. & Schwartz, L.B. (1995). Quantitation of tryptase, chymase, Fc epsilon RI alpha, and Fc epsilon RI gamma mRNAs in human mast cells and basophils by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Immunol*, 154, 5472-80.
- Xiang, Z. & Nilsson, G. (2000). IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells. *Clin Exp Allergy*, 30, 1379-1386.
- Yaar, M., Eller, M.S., DiBenedetto, P., Reenstra, W.R., Zhai, S., McQuaid, T., Archambault, M. & Gilchrist, B.A. (1994). The trk family of receptors mediates nerve growth factor and neurotrophin-3 effects in melanocytes. *J Clin Invest*, 94, 1550-62.
- Yaar, M., Grossman, K., Eller, M. & Gilchrist, B.A. (1991). Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J Cell Biol*, 115, 821-8.
- Yamamoto, T., Hartmann, K., Eckes, B. & Krieg, T. (2000). Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit. *Immunology*, 99, 435-9.
- Yamamoto, T., Katayama, I. & Nishioka, K. (1998). Expression of stem cell factor in the lesional skin of systemic sclerosis. *Dermatology*, 197, 109-14.
- Yamamoto, T., Takagawa, S., Katayama, I. & Nishioka, K. (1999). Anti-sclerotic effect of transforming growth factor-beta antibody in a mouse model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol*, 92, 6-13.
- Yamashiro, M., Kouda, W., Kono, N., Tsuneyama, K., Matsui, O. & Nakanuma, Y. (1998). Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study. *Virchows Arch*, 433, 471-9.
- Yousem, S.A. (1997). The potential role of mast cells in lung allograft rejection. *Hum Pathol*, 28, 179-82.
- Zambruno, G., Marchisio, P.C., Marconi, A., Vaschieri, C., Melchiori, A., Giannetti, A. & De Luca, M. (1995). Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. *J Cell Biol*, 129, 853-65.
- Zhang, S., Anderson, D.F., Bradding, P., Coward, W.R., Baddeley, S.M., MacLeod, J.D., McGill, J.I., Church, M.K., Holgate, S.T. & Roche, W.R. (1998). Human mast cells express stem cell factor. *J Pathol*, 186, 59-66.
- Zhang, Y., Ramos, B.F., Jakschik, B., Baganoff, M.P., Deppeler, C.L., Meyer, D.M., Widomski, D.L., Fretland, D.J. & Bolanowski, M.A. (1995). Interleukin 8 and mast cell-generated tumor necrosis factor-alpha in neutrophil recruitment. *Inflammation*, 19, 119-32.
- Zuberbier, T., Schadendorf, D., Haas, N., Hartmann, K. & Henz, B.M. (1997). Enhanced P-selectin expression in chronic and dermographic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol*, 114, 86-9.
- Zuberbier, T., Schwarz, S., Hartmann, K., Pfrommer, C. & Czarnetzki, B.M. (1996). Histamine releasability of basophils and skin mast cells in chronic urticaria. *Allergy*, 51, 24-8.
- Zweiman, B., Moskovitz, A.R. & von Allmen, C. (1998). Comparison of inflammatory events during developing immunoglobulin E-mediated late-phase reactions and delayed-hypersensitivity reactions. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5, 574-7.

## 7. Kooperation und Danksagung

Die lange Inkubationszeit der vorliegenden Arbeit war bedingt durch unruhige Zeiten bei der Umstrukturierung der Universitätshautkliniken des Rudolf Virchow-Klinikums und der Charité, dann durch meine Arbeitsaufnahme als leitende Oberärztin in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie des Krankenhauses Neukölln in Berlin.

Die Arbeiten über Narbengewebe und Urtikaria sind in Zusammenarbeit mit dem dermatologischen Forschungsteam des Virchow-Klinikums der Charité entstanden. Bedanken möchte ich mich hier besonders bei Frau Dr. Pia Welker, Herrn Dr. Bernd Algermissen und Herrn Dr. Norbert Haas, ebenso bei Frau Dr. Ingrid Feldmann-Böddiker, deren Dissertation ich betreut habe. Für technische Hilfe und Expertise bin ich Frau Carola Wesendahl, Frau Regina Nordheim und Herrn Sven Guhl dankbar.

Ganz entscheidend für Entwicklung und Entstehung der vorliegenden Arbeit war die Begleitung durch Frau Prof. Beate Henz, die fachliche Anregung und fundierte Kritik beitrug. Dafür gebühren ihr Anerkennung und mein ganz besonderer Dank. Herrn Prof. W. Sterry bin ich für wohlwollende Förderung verbunden.

**Eidesstattliche Versicherung**  
gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift